

KÜNSTLICHE UND NATÜRLICHE DDT-BINDENDE POLYPEPTIDE

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE

VORGELEGT DER

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

DER

UNIVERSITÄT ZÜRICH

VON

STEPHAN KLAUSER

AUS FLUMS SG

BEGUTACHTET VON HERRN

PROF. Dr. B. GUTTE

ZÜRICH 1988

ZENTRALSTELLE DER STUDENTENSCHAFT



KÜNSTLICHE UND NATÜRLICHE DDT-BINDENDE POLYPEPTIDE

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE

VORGELEGT DER

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

DER

UNIVERSITÄT ZÜRICH

VON

STEPHAN KLAUSER

AUS FLUMS SG

BEGUTACHTET VON HERRN

PROF. Dr. B. GUTTE

ZÜRICH 1988

ZENTRALSTELLE DER STUDENTENSCHAFT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Für Gret, Tobias und Ursina

INHALTSVERZEICHNIS

Dank	i
Zusammenfassung	ii
Einleitung	1
1.1 Konstruktion von Polypeptiden	1
1.1.1 Ein künstliches DDT-bindendes Polypeptid (DBP)	2
1.2 Chemische Peptidsynthese	10
1.2.1 Die Festkörper-Peptidsynthese	12
1.2.2 Automatisierung der chemischen Peptidsynthese	18
1.3 Antikörper gegen synthetische Peptide	23
1.3.1 Antikörper gegen das DDT-bindende Polypeptid	24
1.4 Antikörper gegen DDT	25
1.4.1 Erzeugung von Anti-DDT-Antikörpern	27
Material und Methoden	33
2.1 Peptidsynthese	33
2.1.1 Synthese von Thr ¹⁵ , Thr ¹⁷ -DBP und Trp ¹⁶ -DBP	33
2.2 Reinigung und Charakterisierung der Peptide	39
2.2.1 Chromatographie	39
2.2.2 Analytische Charakterisierung der Peptide	41
2.2.3 Bestimmung der Peptid-DDT-Dissoziationskonstanten	43
2.2.4 Circulardichroismus	44
2.2.5 UV-Absorptionsspektren	44
2.3 Bau des Peptidsynthese-Automaten	45
2.3.1 Mechanischer Aufbau	45
2.3.2 Steuerung und Elektronik	49
2.3.3 Steuerprogramm	51
2.4 Erzeugung und Charakterisierung der Anti-DBP-Antikörper	53
2.5 Antikörper gegen DDT	55

2.5.1	Synthese von 5,9-Diaza-11,11,11-trichloro- 10,10-bis-(p-chlorophenyl)- 4,8- dioxo-undecansäure	55
2.5.2	Kupplung des DDT-Derivats an Rinderserumalbumin	58
2.5.3	Immunisierung und Charakterisierung der Antikörper	59
Resultate und Diskussion		61
3.1	Synthese von Thr ¹⁵ , Thr ¹⁷ -DBP und Trp ¹⁶ -DBP	61
3.2	Reinigung und Charakterisierung der Peptide	63
3.2.1	Gelchromatographie	63
3.2.2	"Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography"	67
3.2.3	Bestimmung der N-Termini	71
3.2.4	Exopeptidase-Verdauungen	71
3.2.5	Sequenzierung	71
3.2.6	Bestimmung der Peptid-DDT-Dissoziationskonstanten	72
3.2.7	UV-Absorptionsspektren und Circular dichroismus	73
3.3	Synthese-Automat	77
3.4	Antikörper gegen das DDT-bindende Polypeptid	79
3.5	Antikörper gegen DDT	84
3.5.1	Synthese von 5,9-Diaza-11,11,11-trichloro- 10,10-bis-(p-chlorophenyl)-4,8-dioxo-undecansäure	84
3.5.2	Kupplung des DDT-Derivats an Rinderserumalbumin	86
3.5.3	Immunisierung und Nachweis der Antikörper	87
Literaturverzeichnis		90
Curriculum Vitae		95

DANK

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. B. Gutte für die unermüdliche Unterstützung und die vielen guten Ratschläge, die er mir während der Ausführung dieser Arbeit zukommen liess, herzlich danken.

Ebenfalls danken möchte ich meinen Arbeitskollegen in unserer Forschungsgruppe für die gute Zusammenarbeit und zahlreiche fruchtbare Diskussionen.

Im Weiteren gilt mein Dank:

- D. Holenstein und D. Bürgisser für die wertvolle Mitarbeit und die Durchführung zahlreicher Experimente.
- B. van Wieringen und F. van Wieringen, ohne deren tatkräftige Mithilfe der Bau des Peptidsynthese-Automaten nicht möglich gewesen wäre.
- Prof. Dr. H. Binz für die Ausführung der Immunpräzipitationstests und für die Lieferung von ^{125}I -Protein A.
- PD Dr. M. Aguet für die Unterstützung und die zahlreichen Ratschläge bei der Durchführung der immunologischen Experimente.
- Prof. Dr. M. Hesse, Dr. J. Bieri und Dr. R. Prewé für die Ausführung der Röntgenstrukturanalyse.
- P. Hunziker für die Mithilfe bei der Ausführung der Sequenzierarbeiten.

ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von der Konstruktion eines aus 24 Aminosäureresten bestehenden DDT-bindenden Polypeptids (DBP) mit definierter Sekundärstruktur wurden 2 Analoga synthetisiert (Thr¹⁵, Thr¹⁷-DBP; Trp¹⁶-DBP). Durch den gezielten Austausch einzelner Aminosäurereste wurde versucht, die nur aus dem Modell bekannte Ligandbindungsstelle des DBP näher zu charakterisieren.

Die Synthese der beiden Analoga wurde nach der Merrifield- Festkörpersynthese-Strategie mit Hilfe eines computergesteuerten Peptidsynthese- Automaten durchgeführt. Konstruktion und Aufbau des Synthese-Automaten, sowie Programmierung des zur Steuerung eingesetzten Mikrocomputers erfolgten ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit. Durch Synthese mehrerer Peptide konnte die Funktionsfähigkeit und Zuverlässigkeit des Systems gezeigt werden.

Neben dem Originalpeptid (DBP) und den beiden Analoga wurde ein drittes, bereits vorliegendes Analogon (Val¹⁴-DBP) in die Untersuchungen mit einbezogen. Durch Messung der Dissoziationskonstanten der Peptid-DDT-Komplexe konnte die postulierte Ligandbindungsstelle bestätigt werden.

Durch Immunisierung von 2 Kaninchen mit dem DDT-bindenden Polypeptid konnten entsprechende Antikörper erzeugt werden. Diese wurden, nach Isolation und Reinigung, für die Charakterisierung der immunologischen Eigenschaften des DBP und der Analoga eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die in den Analoga ausgetauschten Aminosäurereste keinen Einfluss auf die Erkennung der Antigene durch die Antikörper ausüben. Daraus kann geschlossen werden, dass das DBP und die Analoga grösstenteils identische Sekundärstrukturen aufweisen. Desweiteren konnte durch Verwendung chymotryptischer Fragmente des DBP gezeigt werden, dass für eine optimale Antigen-Antikörper-Wechselwirkung das intakte Peptid erforderlich ist.

In anderen Arbeiten wurden diese Antikörper für den Nachweis des Expressionsprodukts eines synthetischen, in *E.coli* klonierten DBP-Gens eingesetzt.

Um ein zum konstruierten, synthetischen DDT-bindenden Polypeptid vergleichbares natürliches Peptid oder Protein zu erhalten, wurden Versuche zur Erzeugung von Anti-DDT-Antikörpern unternommen. Da DDT selbst keine immunogene Wirkung zeigt, wurde, in 4 Synthesestufen, ausgehend vom DDT-Derivat Kelthan, ein für die Kupplung an BSA geeignetes DDT-Carboxyl-Derivat synthetisiert. Nach erfolgreicher Kupplung dieses Derivats an BSA wurde das Konjugat zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die gebildeten Antikörper konnten in radioimmunologischen Tests nachgewiesen werden. Die Experimente zur Bestimmung der Spezifität und der Empfindlichkeit des radioimmunologischen Tests zeigten, dass von den getesteten Substanzen (DDT, DDA, p-Chlorophenol, p-Chlorobenzoessäure) DDT die grösste Kreuzreaktivität aufweist und in Konzentrationen von 50 bis 100 nM noch eindeutig nachgewiesen werden kann.

EINLEITUNG

1.1 KONSTRUKTION VON POLYPEPTIDEN

Ein relativ junges und noch wenig bearbeitetes Gebiet in der Anwendung synthetischer Polypeptide ist die Konstruktion neuer, in der Natur nicht vorkommender Polypeptide. Begonnen hat diese Entwicklung mit Versuchen, anhand natürlicher Vorlagen, neue, biologisch aktive Modellpeptide herzustellen. Als Beispiele seien hier Arbeiten über die Simulation von Antikörper-Bindungsstellen und Rezeptoren (Lee & Atassi, 1976; Atassi, 1984; Kullmann, 1984), Peptidhormonen (Veber et al., 1981), oder Enzymen (Chakravarty et al., 1973) und Enzyminhibitoren (Kitchell & Dyckes, 1982) erwähnt. Gemeinsames Merkmal der meisten bisher zu diesem Forschungsgebiet erschienenen Publikationen ist das Vorhandensein einer natürlichen Vorlage, d.h. es wurde versucht, das Peptid einer strukturellen Untereinheit eines grösseren, natürlichen Proteins nachzuformen. Arbeiten über die Konstruktion von Oligo- oder Polypeptiden mit gänzlich neuen Funktionen sind bis anhin jedoch kaum zu finden (siehe Moser et al., 1985).

Die Hauptschwierigkeiten dürften dabei, von peptidsynthetischen Problemen vorerst einmal abgesehen, in den noch sehr beschränkten Kenntnissen über Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion eines Proteins oder Peptids liegen. Mit Hilfe der bekannten Sekundärstrukturvorhersage-Methoden (Argos et al., 1976; Chou & Fasman, 1978; Levitt, 1978) können zwar einfache Strukturelemente wie α -Helix, β -Faltblatt oder β -"Turn" mit beträchtlicher Zuverlässigkeit bestimmt werden. Mit dem heutigen Wissen über Struktur-Funktionsbeziehungen ist es jedoch nach wie vor kaum möglich, bei bekannten Sekundärstruktureinheiten (aus der Vorhersage) die relative räumliche Anordnung solcher Strukturelemente zueinander (Tertiär- und Quartärstrukturen) und deren Eigenschaften für die Funktion eines Proteins routinemässig zu bestimmen. Einzig die Röntgenkristallographie und 2-dimensionales NMR sind in der Lage, zumindest über strukturelle Aspekte, entsprechende Daten zu liefern. Speziell bei röntgenkristallographischen Untersuchungen zeigen sich aber häufig Probleme mit der Verfügbarkeit qualitativ genügender Kristalle. Die Züchtung solcher Kristalle ist oftmals, wie auch Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe zeigen, ein schwieriges und zeitraubendes Unterfangen.

Neben solchen strukturellen Aspekten müssen für die Konstruktion neuer Modellpeptide aber auch die Möglichkeiten der chemischen Peptidsynthese berücksichtigt werden. Im allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass Peptide bis zu einer Grösse von circa 30-40 Aminosäuren noch in guter Reinheit dargestellt werden können. Grössere Peptide oder gar Proteine können jedoch, trotz grosser Anstrengungen und entsprechender Erfolge in der Entwicklung der Peptidsynthese-, Reinigungs- und Analysetechnik (neue Synthesestrategien, HPLC, Affinitätschromatographie etc.) nach wie vor kaum als homogene Produkte hergestellt werden. Mit den in den letzten Jahren erzielten, enormen

Fortschritten im Bereich der Molekularbiologie eröffnen sich jedoch auch für den peptidsynthetisch interessierten Proteinchemiker völlig neue Perspektiven. Ueber die ebenfalls chemische Synthese der codierenden Gensequenzen und deren Klonierung und Expression in Mikroorganismen bestehen Möglichkeiten, völlig neue, künstliche Polypeptide und Proteine zu produzieren. Durch gezielte Mutagenese ist man zudem in der Lage, derartige und auch natürliche Proteine in ihrer Aminosäuresequenz spezifisch zu modifizieren und so allenfalls neue Erkenntnisse zu den Problemkreisen Strukturbildung, Struktur-Funktions-Relation, enzymatische Mechanismen oder Rezeptorfunktionen und -eigenschaften etc. zu gewinnen. Es darf jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass auch bei der Protein- und vor allem bei der Peptidsynthese auf gentechnologischem Weg stets mit Schwierigkeiten gerechnet werden muss. Beispielsweise können Probleme mit dem Expressionssystem, mit intrazellulärer Proteolyse oder mit der Isolation und Reinigung des Genprodukts auftreten.

Trotz diesen Einschränkungen zeigen die bisherigen Arbeiten über Modellpeptide ermutigende Resultate, welche auf ein vermehrtes Interesse an diesem Forschungsgebiet hoffen lassen.

1.1.1 Ein künstliches DDT-bindendes Polypeptid

Vor diesem Hintergrund wurde, bestärkt durch die bisher erzielten Erfolge (Gutte et al., 1979), die Idee, ein künstliches, funktionelles Polypeptid zu konstruieren, erneut aufgegriffen. Hauptziel der Konstruktion war es, ein System zu entwickeln, das in einem ersten Schritt neue, aus theoretischen und praktischen Gesichtspunkten interessante Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen der Primärstruktur eines Polypeptids und den daraus resultierenden Sekundärstruktur-Funktionsbeziehungen, liefert. Eine weitere Entwicklung des Systems in Richtung Enzymmodell wurde ebenfalls ins Auge gefasst.

Eine der wohl einfachsten und noch am besten überschaubaren Aufgaben eines natürlichen oder künstlichen Polypeptids ist dessen Funktion als ligandbindender Rezeptor. Bei natürlichen Rezeptoren zieht die Bindung des Liganden normalerweise weitere Reaktionen, wie z.B. Ausbildung von Membrankanälen, Aktivierung von Enzymen oder Regulation der Genexpression nach sich (Gutte et al., 1984). Antikörper, die durch Bindung des Antigens (Bakterien, Viren etc.) dessen Wirkung neutralisieren, sind wohl die Paradebeispiele für ligandbindende Polypeptide.

Die spezifische Ligandbindungsstelle der Rezeptoren ist meist eine räumlich kleine, aus relativ wenigen Aminosäureresten gebildete Struktureinheit des gesamten Proteins. Die Simulation einer derartigen Bindungsstelle und deren Ligandbindungsfähigkeit sollte demzufolge schon mit kleinen, synthetisch noch gut zugänglichen Modellpeptiden möglich sein.

Die Wahl der Verbindung 2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethan (Abb. 1), bekannt unter dem

Kürzel DDT, als Ligand des zu konstruierenden, künstlichen Modellpeptids eröffnet zahlreiche interessante und neue Fragestellungen.

Als erstes rein synthetisches und trotz Einschränkungen nach wie vor in grossen Mengen eingesetztes Insektizid, ist diese Substanz immer noch von grosser ökologischer und gesundheitlicher Bedeutung (siehe Kap. 1.4). Auch existiert bis heute kein natürliches, in seiner Struktur bekanntes Pendant zu einem DDT-bindenden Polypeptid. Antikörper gegen DDT sind bisher nicht beschrieben worden und über das aus DDT-resistenten Hausfliegen (*Musca domestica*) isolierte Enzym DDT-Dehydrochlorinase, das zwar isoliert und gereinigt worden ist (Clark & Shamaan, 1984; Lipke & Kearns, 1959 a, b), liegen bis anhin noch keine Strukturdaten vor.

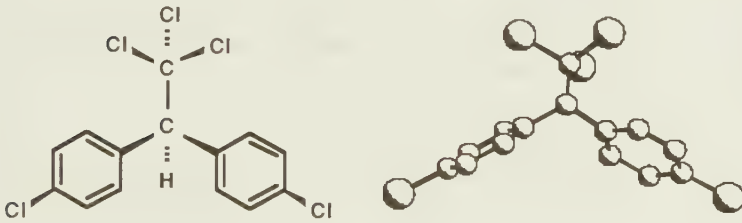


Abbildung 1: Strukturformel und "Ball- & Stick-" Modell (nach Röntgenstrukturanalyse) von 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethan (4,4'-DDT)

Daneben spielten auch die chemisch-physikalischen Eigenschaften des Insektizids für die Konstruktion des Modellpeptids eine wichtige Rolle. Aufgrund seines stark hydrophoben Charakters, sowie dem Fehlen irgendwelcher funktioneller Gruppen, sind Wechselwirkungen, die zu einer Bindung an einen Rezeptor (Modellrezeptor) führen können, klar definiert. Es kann sich in diesem Fall ausschliesslich um spezifische Van-der-Waals-Interaktionen handeln.

Zusammen mit der räumlichen Struktur des DDT-Moleküls (Abb. 1) waren somit die wichtigsten, grundlegenden Parameter für die Konstruktion einer Modellbindungsstelle gegeben.

Ein DDT-bindendes Polypeptid muss demzufolge, zumindest im engeren Bereich der Bindungsstelle, ebenfalls von hydrophobem Charakter sein. Eine Bindung des Liganden könnte dabei über spezifische Interaktionen zwischen den aromatischen p-Chlorophenyl-Ringen des DDT-Moleküls und



aromatischen Aminosäureseitenketten des Peptids ("Aromaten-Stacking") zustande kommen. Eventuell vorhandene aliphatische Seitenketten könnten die Bindung des Liganden durch hydrophobe Wechselwirkungen noch zusätzlich stabilisieren.

Durch Modellbau und unter Berücksichtigung der Strukturvorhersagemethoden von Chou & Fasman (Chou & Fasman, 1978) und Levitt (Levitt, 1978) wurde von Prof. Dr. B. Gutte (Biochemisches Institut, Universität Zürich) ein aus 24 Aminosäureresten zusammengesetztes Polypeptid entworfen (Abb. 2).

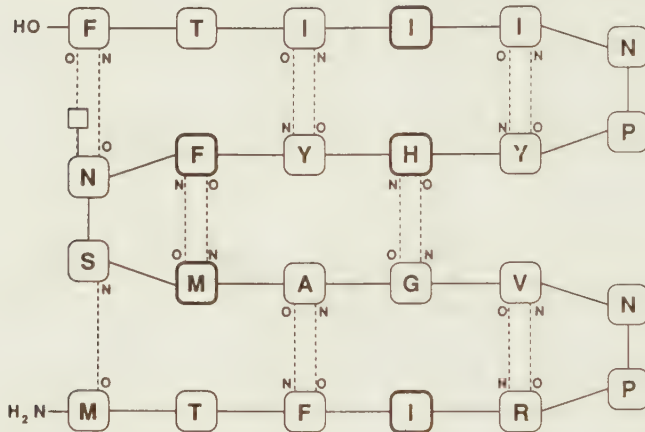


Abbildung 2: Aminosäuresequenz und postulierte, 4-strängig antiparallele β-Faltblatt-Struktur des DDT-bindenden Polypeptids. Nach Modell an der DDT-Bindungsstelle beteiligte Aminosäuren sind fettgedruckt. Gestrichelte Linien stellen mögliche Wasserstoffbrücken zwischen NH- und CO-Gruppen der Peptid-Hauptkette (und der Seitenkette von Asn 13) dar.

Die gewählte Anordnung der 24 Aminosäurereste weist, wie eine Analyse nach den bekannten Strukturvorhersagemethoden (Chou & Fasman, 1978; Argos et al., 1976) zeigt, ein hohes Potential zur Ausbildung der gewünschten, 4-strängig antiparallelen β-Faltblatt-Struktur auf.

Der hohe Anteil hydrophober Aminosäuren, deren Raumbedarf und gegenseitige Wechselwirkungen

in wässrigem Milieu sollte, gemäss Literatur (Lee & Richards, 1971; Richards, 1974; Finney, 1975) zu einer zusätzlichen Unterstützung für die Ausbildung stabiler, kompakter Strukturen führen. Stabilisierend sollten sich auch die zahlreich vorhandenen Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den CO- und den NH-Gruppen der Peptidkette auswirken.

Im Kalottenmodell bilden die Seitenketten der Aminosäuren Ile 4, Met 11, Phe 14, His 16 und Ile 21 eine zum DDT-Molekül komplementäre Bindungsstelle. Auf der "Rückseite" des Peptidmoleküls entsteht, bedingt durch die zur Bildung einer β -Faltblatt-Struktur eingesetzten Aminosäuren eine zweite, im Modell sterisch allerdings ungünstigere Ligand- Bindungsstelle (Phe 3, Arg 5, Val 8, Tyr 15, Tyr 17, Ile 20 und Ile 22).

Ob das nach der Festphasen-Methode (Merrifield, 1963; Barany & Merrifield, 1980) synthetisierte Peptid (Moser et al.,1983; Moser, 1986) tatsächlich die postulierte Struktur und damit auch die erwähnten Ligandbindungsstellen aufweist, konnte bisher jedoch nicht eindeutig gezeigt werden. Trotz guter Hinweise aus Circular dichroismus- (Moser, 1986) und Laser-Raman-Messungen (Weilenmann, 1983), sowie der mehrfachen Bestimmung der Peptid-Ligand-Dissoziationskonstanten (Moser et al., 1983; Moser, 1986) werden vermutlich erst die auf den bereits vorhandenen Primärkristallen des Peptids (Moser et al., 1983) basierenden Kristallisationsversuche und spätere röntgenkristallographische Studien diesbezüglich eindeutige Daten liefern können.

Was jedoch die Untersuchungen der Bindungsstelle(n) und deren Spezifität für DDT betrifft, bietet die chemische Peptidsynthese zusätzliche, interessante Möglichkeiten.

1	6	12	
H-Met-Thr-Phe-Ile-Arg-Pro-Asn-Val-Gly-Ala-Met-Ser-			
13	18	24	DBP
Asn-Phe-Tyr-His-Tyr-Pro-Asn-Ile-Ile-Ile-Thr-Phe-OH			
1	6	12	
H-Ser-Arg-Pro-Thr-Ile-Asn-Asn-Ile-Thr-Tyr-Phe-Val-			
13	18	24	Z-DBP
Pro-Gly-His-Ala-Phe-Met-Tyr-Met-Asn-Ile-Ile-Phe-OH			

Abbildung 3: Sequenz des DDT-bindenden Polypeptids (DBP) und des Zufallspeptids (Z-DBP)
(identische Aminosäurezusammensetzungen)

In einem ersten Ansatz konnte durch Synthese eines Peptids mit derselben Aminosäurezusammensetzung, aber zufälliger Sequenz (Abb. 3) gezeigt werden, dass die DDT-Bindungsfähigkeit des konstruierten Peptids effektiv sequenzabhängig ist (Weilenmann, 1983; Moser, 1986).

Die im Vergleich zum konstruierten Peptid ($K_D = 10^{-6}$ bis 10^{-5} M) ungefähr 150-mal schwächere DDT-Bindungsfähigkeit kann einerseits auf unspezifische, hydrophobe Wechselwirkungen, andererseits auf die trotz zufälliger Sequenz offenbar doch vorhandenen Strukturanteile (Weilenmann, 1983) (β -Faltblatt gemäss Vorhersage nach Argos (Argos et al., 1976)) zurückgeführt werden.

Diesbezüglich präzisere Informationen sind aus Studien mit Peptid-Analoga, bei welchen nur einzelne, im Modell an der Ligandbindung direkt beteiligte Aminosäuren spezifisch ausgetauscht werden, zu erwarten.

Ein Analogon, bei dem die vermutlich an der DDT-Bindung beteiligte aromatische Seitenkette von Phenylalanin 14 gegen die ebenfalls hydrophobe, aber nicht aromatische Isopropylgruppe von Valin substituiert ist (Abb. 4), wurde von M. Linden synthetisiert und charakterisiert. Eine erste Bestimmung der Ligand-Dissoziationskonstanten nach der Methode von Hummel und Dreyer (Hummel & Dreyer, 1962) ergab für das Val¹⁴-Peptid eine im Vergleich zum Original (DBP) schwachere Bindung des Liganden (Linden, 1986).

Von den vielen weiteren Möglichkeiten des Austausches von Aminosäuren wurden für diese Arbeit die Substitution der in den Positionen 15 und 17 auftretenden Tyrosinreste durch Threonin (Thr¹⁵, Thr¹⁷-DBP), sowie von Histidin 16 gegen Tryptophan (Trp¹⁶-DBP) ausgewählt (Abb. 4)

Der Ersatz der beiden Tyrosinreste sollte bestätigen, dass diese, wie im Modell, einerseits nicht direkt in die Struktur der Bindungsstelle mit hoher DDT-Komplementarität involviert sind und dass andererseits die Bindungsstelle mit geringer Komplementarität keinen wesentlichen Beitrag an die DDT-Bindung liefert

Zudem ist durch diesen Tyrosin $\rightarrow$ Threonin Austausch bei Erhalt des β Faltblattpotentials (Abb. 5), aufgrund der leichten Erniedrigung der Gesamthydrophobizität mit einer verbesserten Wasserlöslichkeit des Threonin-Analogons zu rechnen.

1	6	12	
H-Met-Thr-Phe-Ile-Arg-Pro-Asn-Val-Gly-Ala-Met-Ser-			
13	18	24	DBP
Asn-Phe-Tyr-His-Tyr-Pro-Asn-Ile-Ile-Ile-Thr-Phe-OH			
1	6	12	
H-Met-Thr-Phe-Ile-Arg-Pro-Asn-Val-Gly-Ala-Met-Ser-			
13	18	24	Thr ¹⁵ ,Thr ¹⁷ -DBP
Asn-Phe- <u>Thr</u> -His- <u>Thr</u> -Pro-Asn-Ile-Ile-Ile-Thr-Phe-OH			
1	6	12	
H-Met-Thr-Phe-Ile-Arg-Pro-Asn-Val-Gly-Ala-Met-Ser-			
13	18	24	Trp ¹⁶ -DBP
Asn-Phe-Tyr- <u>Trp</u> -Tyr-Pro-Asn-Ile-Ile-Ile-Thr-Phe-OH			
1	6	12	
H-Met-Thr-Phe-Ile-Arg-Pro-Asn-Val-Gly-Ala-Met-Ser-			
13	18	24	Val ¹⁴ -DBP
Asn- <u>Val</u> -Tyr-His-Tyr-Pro-Asn-Ile-Ile-Ile-Thr-Phe-OH			

Abbildung 4: Sequenzen des DDT-bindenden Polypeptids (DBP) und der 3 untersuchten Analoga. Ausgetauschte Aminosäurereste sind unterstrichen.

		DBP	Thr ¹⁵ ,Thr ¹⁷ -DBP	Trp ¹⁶ -DBP	Val ¹⁴ -DBP
Met					
Thr					
Phe					
Ile					
Arg		bbbb t	bbbb t	a bbbb	bbbb t
Pro		a bb t c	a bb t c	aa bb c	a bb t c
Asn		a bb cc	a bb cc	a bb cc	a bb cc
Val		a bbb c	bbb cc	a bbb c	a bbb c
Gly		bb ccc	bb ccc	bb ccc	bb ccc
Ala		a b t cc	a b t cc	a b tt c	bb tt c
Met		a bb tt	a b ttt	a b tt c	bbb t c
Ser		a ttt c	a ttt c	a b ttt	bbb tt
Asn		bb tt c	bb ttt	bb tt c	bbb t c
Phe	Val	aa b t c	aa b t c	a bb t c	bbbbb
Tyr	Thr	a b tt c	a b t cc	bbb cc	bb tt c
His	Tip	a b tt c	a b t cc	a bb t c	bb tt c
Tyr	Thr	a bb tt	aa b t c	bbb tt	bb ttt
Pro		bb tt c	aa b cc	bbb t c	bb tt c
Asn		bbb t c	bb ccc	bb ccc	bbb cc
Ile		bbbb c	bbbb c	bbbb c	a bbb c
Ile					
Ile					
Thr					
Phe					

Abbildung 5: Vergleich der Sekundärstruktur-Vorhersagen nach Argos et al., (1976) für das DDT-bindende Polypeptid (DBP) und die 3 untersuchten Analoga
a: α -Helix b: β -Faltblatt t: Turn c: Reststrukturen (ungeordnet)

Ein Vergleich der Hydrophobizitätsprofile der 4 Peptide (DBP, Thr¹⁵,Thr¹⁷-DBP, Trp¹⁶-DBP und Val¹⁴-DBP) nach den Methoden von Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) und Hopp und Woods (Hopp & Woods, 1983) zeigt übereinstimmende Resultate. In Abbildung 6 sind die Profile nach Hopp und Woods dargestellt.

Die Substitution von Histidin 16 gegen Tryptophan ergibt nach Argos (Argos et al , 1976) sogar noch eine Erhöhung des β Potentials im Peptid. Aus der Erhöhung der Hydrophobizität sowohl des Gesamtpeptids, als auch im engeren Bereich der postulierten DDT-Bindungsstelle könnte eventuell, trotz erhöhten sterischen Ansprüchen der Tryptophan-Indol-Seitenkette, eine verbesserte DDT Bindung resultieren. Gleichzeitig ist aber auch mit einer, im Vergleich zum DBP, zusätzlichen Verschlechterung der Löslichkeit des Analogons in polaren Medien zu rechnen.

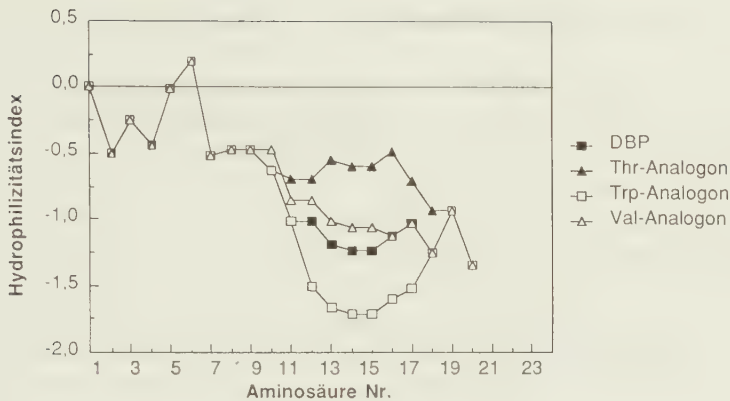


Abbildung 6: Hydrophilizitätsprofile der 4 Peptide nach Hopp und Woods (1983)

Die Kenntnis des Struktur- und Ligandbindungsverhaltens dieser und eventuell weiterer, neuer Analoga des ursprünglichen DBP dürfte zahlreiche zusätzliche Informationen für das Design eines optimal DDT-bindenden Polypeptids, respektive neue Optimierungsmöglichkeiten für das bereits bestehende Modell, liefern.

Diese Optimierung zielt jedoch nicht nur auf eine Verbesserung der DDT-Bindung, sondern vor allem auf die Erarbeitung der theoretischen Grundlagen zur gezielten Modulation der Ligandbindungsfähigkeit durch das künstliche Rezeptormodell ab. Dies ist auch speziell für die bereits in Angriff genommenen Arbeiten zur Konversion des DDT-bindenden Polypeptids in ein DDT-modifizierendes Enzymmodell (Langen, 1986) von grossem Interesse, dürften doch die Art und die Stärke der DDT-Bindung einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität eines derartigen Enzym-Modell-Systems ausüben. Die Kenntnis dieser und weiterer Zusammenhänge könnte, unter Einbezug anderer Techniken aus den Bereichen Molekularbiologie, Gentechnologie, Immunologie etc., neue Möglichkeiten für die Konstruktion und den Einsatz solcher Modell-Rezeptoren oder gar Modell-Enzyme eröffnen.

1.2 CHEMISCHE PEPTIDSYNTHESE

Der Wunsch, Peptide oder vielleicht sogar Proteine rein chemisch aus ihren Bausteinen, den Aminosäuren herzustellen, ist schon sehr alt. Bereits anfangs des Jahrhunderts publizierte Emil Fischer (Fischer & Fourneau, 1901) erste Arbeiten über die Synthese einfacher Peptide. Die grossen Fortschritte und Entwicklungen in der Peptidsynthese wurden aber erst in der 2. Hälfte dieses Jahrhunderts gemacht. Als Beispiele mögen hier die erfolgreiche Synthese eines Peptidhormons (du Vigneaud et al., 1953) oder die Totalsynthese eines aktiven Enzyms (Gutte & Merrifield, 1971) dienen. Unterdessen sind jedoch zahlreiche Artikel über die Synthese kleinerer und grösserer Peptide erschienen. Einen Ueberblick gibt der in unserer Gruppe verfasste Artikel (Moser et al., 1985).

Das an und für sich einfache Grundprinzip der chemischen Peptidsynthese, die Verknüpfung zweier Aminosäuren über eine neu zu bildende Amidbindung (Abb. 7), bringt in der praktischen Ausführung einige Probleme mit sich. Da es sich bei den Aminosäuren um bi- oder trifunktionelle Moleküle handelt, müssen die geeigneten funktionellen Gruppen spezifisch aktiviert und die restlichen Gruppen mit geeigneten Schutzgruppen versehen werden können.

Aus chemischen Gründen wird die Peptidkette, im Gegensatz zur natürlichen Protein- Biosynthese, von der C-terminalen zur N-terminalen Aminosäure hin aufgebaut (Abb. 7). Mit der Einführung der Festphasen-Peptidsynthese durch Merrifield (Merrifield, 1963) konnten zahlreiche Probleme, die bei der Synthese in Lösung auftreten, elegant umgangen werden. So entfallen zum Beispiel die nach jedem Kettenverlängerungszyklus notwendigen und zeitraubenden Reinigungs- und Aufarbeitungsprozeduren, da bei der Festphasen-Synthese die wachsende Peptidkette am unlöslichen Träger verankert bleibt. Dies ermöglicht ein einfaches Ausspülen von Reaktionsnebenprodukten und Verunreinigungen. Desweiteren entfallen die bei der Synthese grösserer Peptide auftretenden Probleme mit der Löslichkeit der geschützten Peptide in organischen Lösungsmitteln. Dadurch sind bei der Festphasen-Peptidsynthese, zumindest theoretisch, grössere Kettenlängen erreichbar. Für die vorliegende Arbeit von speziellem Interesse sind die Möglichkeiten für eine relativ einfache Automatisierung des Syntheseablaufs.

Trotz all den Fortschritten in der Synthesetechnik ist jedoch der Wunsch, ganze Proteine rein chemisch herzustellen, nach wie vor nicht erfüllbar, da mit wachsender Kettenlänge der Peptide, trotz Kupplungsausbeuten im Bereich von 98 bis 100% pro Schritt, die Heterogenität des Endprodukts allzu gross wird.

partiell geschützte (X),
aktivierte (Y) Aminosäure 2

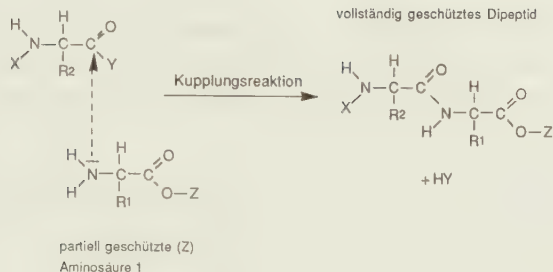


Abbildung 7: Prinzip der chemischen Peptidsynthese:

X : temporäre α -Aminoschutzgruppe;

CO-Y : für die Kupplungsreaktion aktivierte Carboxylgruppe

Z : C-terminale, permanente Schutzgruppe (bei der Festkörperpeptidsynthese
ist Z häufig ein zu 1 % quervernetztes Polystyrol, siehe Abb. 8)

R1, R2 : Aminosäure-Seitenketten

Im allgemeinen beschränkt man sich deshalb auf die Synthese von Peptiden, die aus maximal 40 bis 60 Aminosäureresten zusammengesetzt sind. Für die Darstellung grösserer Peptide oder Proteine scheint zum jetzigen Zeitpunkt der molekularbiologisch-gentechnologische Weg vorteilhafter zu sein. Für die Herstellung kleiner Peptide ist jedoch die chemische Synthese gegenüber dem gentechnologischen Verfahren sowohl vom zeitlichen, als auch vom materialmässigen Aufwand her, die geeignetere Methode. Berücksichtigt man zudem die Möglichkeiten der Automatisierung, können kleine Peptide gar routinemässig hergestellt werden.

Die Anwendungsmöglichkeit derartiger Peptide erstreckt sich über einen weiten Bereich der naturwissenschaftlichen Forschung. Sie werden insbesondere in den Sparten Biochemie, Molekularbiologie, Immunologie und Pharmakologie zunehmend häufiger eingesetzt (Moser et al., 1985). Auch im Bereich der medizinischen Anwendung ist mit steigendem Interesse zu rechnen. Eine Übersicht über die Verwendung synthetischer Peptide in der Medizin liegt im Artikel von Geiger (Geiger, 1984) vor.

1.2.1 Die Festkörper-Peptidsynthese

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit alle Peptide nach der Festkörper- Synthesemethode hergestellt wurden, soll an dieser Stelle auf die Synthese in Lösung nicht näher eingegangen werden. Die Methodik dieser Synthesetechnik wird in Uebersichtsartikeln von Wünsch (Wünsch, 1974) und Bodanszky (Bodanszky, 1985) ausführlich besprochen.

Das Grundprinzip der chemischen Festkörper-Peptidsynthese hat, trotz vielerlei Verbesserungen und neuer Entwicklungen, seit der ersten Publikation von Merrifield (Merrifield, 1963) bis heute keine wesentlichen Aenderungen erfahren. Beim heutigen Stand der Technik ist die Methode derart ausgearbeitet, dass die Synthese eines Peptids von einer entsprechenden Maschine vollautomatisch durchgeführt werden kann. Solche Geräte sind, bei allerdings relativ hohen Preisen, schon seit einiger Zeit auf dem Markt. Ein Ziel dieser Arbeit war, neben anderen, Entwicklung und Bau eines an die Bedürfnisse unseres Labors angepassten Synthese-Automaten (siehe Kap. 1.2.2). Vorerst sollen jedoch die Grundlagen der verwendeten Festkörper-Synthese-Methodik kurz besprochen werden. Da alle eingesetzten Peptide nach der t-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppenstrategie synthetisiert wurden, soll lediglich diese kurz geschildert werden. Informationen zu anderen Strategien finden sich in diversen Literaturstellen, so zum Beispiel im Artikel von Barany und Merrifield (Barany & Merrifield, 1980).

1.2.1.1 Das Trägermaterial

Basis der gesamten Festkörper-Peptidsynthese bildet ein unlösliches, chemisch und mechanisch stabiles, polymeres Trägermaterial. Als eines der am besten geeigneten und am häufigsten eingesetzten Materialien erwies sich, trotz neuen Entwicklungen, ein durch Merrifield eingeführtes Harz, das durch Copolymerisation von Styrol mit Divinylbenzol erhalten wird (Merrifield, 1963). Als funktionelle Gruppe, zur Verankerung der C-terminalen Aminosäure dient eine durch Friedel-Crafts-Alkylierung nachträglich eingeführte Chloromethylgruppe (Abb. 8).

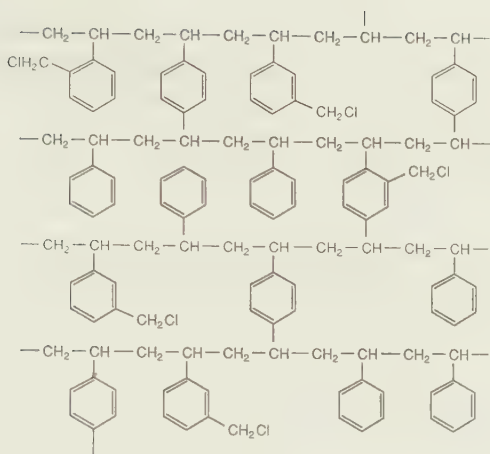


Abbildung 8: Ausschnitt aus dem als Trägermatrix eingesetzten, chloromethylierten Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisat

1.2.1.2 Verankerung der C-terminalen Aminosäure

Wie schon erwähnt, wird bei der chemischen Peptidsynthese, im Gegensatz zur Protein-Biosynthese, die Peptidkette vom C- zum N-Terminus hin aufgebaut. Die C-terminale Aminosäure muss demzufolge über ihre α -Carboxylgruppe an der Trägermatrix verankert werden. Die Stabilität dieser kovalenten Verankerung muss einerseits genügend gross sein, um eine unerwünschte Abspaltung durch die bei der Synthese eingesetzten Reagenzien auszuschliessen. Andererseits muss gerade diese Bindung am Schluss der gesamten Synthese, zur Abspaltung des Peptids vom Harz, selektiv, d. h. ohne Beeinflussung der Peptidbindungen, gespalten werden können. Diese Bedingungen werden durch Verwendung des erwähnten, chloromethylierten Polystyrolharzes nahezu optimal erfüllt. Unter formeller HCl-Abspaltung bildet die C-terminale Aminosäure mit den Chloromethylgruppen des Harzes eine stabile Esterbindung. Neben den sehr häufig verwendeten Triethylammoniumsalzen der Aminosäure-Derivate werden gelegentlich auch die entsprechenden Cäsiumsalze zur Veresterung eingesetzt (Gisin, 1973) (Abb. 9).

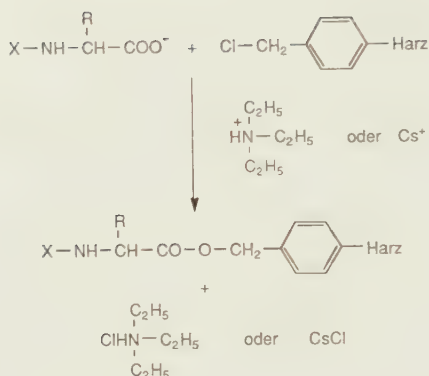


Abbildung 9: Veresterung des C-terminalen Aminosäure-Derivats mit dem chloromethylierten Polystyrol-Harz
 Boc: t-Butyloxycarbonyl-

1.2.1.3 Verlängerung der Peptidkette

Nach der Verankerung der C-terminalen Aminosäure folgen nun die einzelnen Kettenverlängerungsschritte, die sich bis zum Aufbau der gewünschten Peptidsequenz zyklisch wiederholen. Abbildung 10 zeigt diesen Ablauf in schematisierter Form.

Die Knüpfung einer neuen Peptidbindung erfolgt durch nucleophilen Angriff der freien α Aminogruppe der zuletzt gekuppelten Aminosäure (Peptid) auf die aktivierte Carboxylgruppe des in der Sequenz folgenden Aminosäure-Derivats. Zur Aktivierung dieser α -Carboxylgruppe der neu eintretenden Aminosäure sind verschiedene Methoden bekannt. Von diesen sollen jedoch nur die beiden angewendeten diskutiert werden.

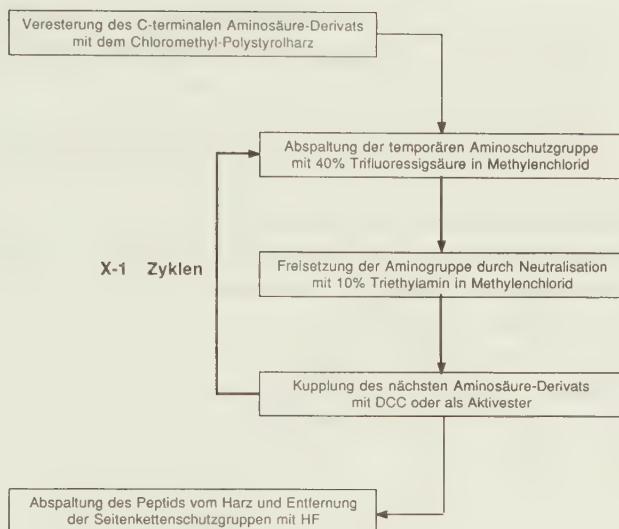


Abbildung 10: Schematischer Ablauf der Festkörper-Peptidsynthese nach der Boc-Schutzgruppen-Strategie. Synthetisiert wird ein X-Mer.

Als Standard-Kupplungsreagens wird, mit Ausnahme der beiden Amide Asparagin und Glutamin, für alle Aminosäure-Derivate Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) verwendet. Der Vorteil der Anwendung von DCC liegt in der schnellen und hohe Ausbeuten liefernden Reaktion. Zudem sind unter den gewählten Bedingungen keine störenden Nebenreaktionen, wie z.B. Racemisierung, zu erwarten. Als Nebenreaktion muss allenfalls die Bildung des nicht reaktiven N-Acylisoharnstoff-Derivats anstelle des zur Kupplung benötigten O-Acylisoharnstoff-Derivats berücksichtigt werden.

Der Reaktionsmechanismus der DCC-Kupplung ist sehr komplex und sehr stark von den herrschenden Reaktionsbedingungen abhängig. Als erste Stufe wird jedoch allgemein die Bildung des O-Acylisoharnstoff-Derivats postuliert. Dieses aktive Zwischenprodukt kann dann über verschiedene Reaktionswege und weitere Zwischenprodukte (symmetrisches Anhydrid; Aktivester; 5(4H)-Oxazolon) durch Angriff der Peptidketten- α -Aminogruppe zu den gewünschten Endprodukten (verlängerte Peptidkette + Dicyclohexylharnstoff) abreagieren.

Wie oben erwähnt, können die beiden Aminosäuren Asparagin und Glutamin, wegen ihrer Amidgruppe in der Seitenkette nicht mit DCC gekuppelt werden. Die verwendete Aktivester-Kupplung

vermeidet die unerwünschte, im Peptid irreversible Dehydratisierung der Amidfunktion zum Nitril. Nachteilig wirkt sich allenfalls die verminderte Reaktionsgeschwindigkeit aus. Diese kann aber durch längere Reaktionszeiten und Verwendung grösserer Ueberschüsse an Aminosäure-Derivat kompensiert werden. Üblicherweise werden die p-Nitrophenylester-Derivate als aktive Spezies eingesetzt. Durch den nucleophilen Angriff der Peptid- α -Aminogruppe und Freisetzung von p-Nitrophenol erhält man die neue Peptidbindung. Aus Gründen der Löslichkeit der verschiedenen Edukte und Produkte wird anstelle von Methylenchlorid N,N-Dimethylformamid als Lösungsmittel eingesetzt. Mit der Kupplungsreaktion ist an und für sich ein Peptidketten-Verlängerungszyklus abgeschlossen. In der praktischen Ausführung folgen anschliessend, wie auch zwischen den einzelnen Reaktionsschritten, noch zahlreiche Spülschritte mit diversen Lösungsmitteln. Dies stellt ja einen der Hauptvorteile der Festkörpersynthese dar, da durch diese einfachen Spülprozeduren alle nicht mehr benötigten oder störenden Reagenzien und Nebenprodukte einfach ausgewaschen werden können. Der genaue zeitliche Ablauf eines gesamten Verlängerungszyklus ist im Kapitel 2.1.1.2 (Tabelle 3) dargestellt.

1.2.1.4 Acidolyse der α -Aminoschutzgruppe

Die Verlängerung der am Harz verankerten Peptidkette beginnt jeweils mit der Abspaltung der N- α Aminoschutzgruppe der zuletzt gekuppelten Aminosäure. Die eingesetzte Boc-Schutzgruppe lässt sich durch Behandlung mit verdünnten Säuren abspalten. Sehr gut bewährt haben sich wasserfreie Lösungen von Trifluoressigsäure (TFA) in Methylenchlorid. Nebenreaktionen, wie Angriff der Peptid-Harzbindung, N t-Butylierung der α Aminogruppen, Spaltung der Seitenkettenschutzgruppen etc. sind unter den gewählten Bedingungen nicht zu befürchten. Formal entstehen bei der Abspaltung, neben der protonierten Aminogruppe, die beiden gasförmigen Produkte Kohlendioxid und Isobuten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass anstelle von Isobuten das Trifluoracetyl-Salz des Isobutyl-Kations gebildet wird. Diese Carbonium-Ionen können, ohne geeignete Gegenmassnahmen, zu einer irreversiblen Modifikation der Seitenketten von Methionin und Tryptophan führen. Aus diesem Grund wird bei allen, auf die Kupplung einer dieser Aminosäuren folgenden Acidolysesritten ein Carboniumionen-Fänger ("Scavenger") zugegeben. Die saurekatalysierte Oxidation des Indolrests von Tryptophan wird durch Zugabe eines Reduktionsmittels (β -Mercaptoethanol) unterdrückt.

Da für eine Kupplung der folgenden Aminosäure die terminale Aminogruppe des wachsenden Peptids für den nucleophilen Angriff in deprotonierter Form vorliegen muss, folgt auf die Acidolyse jeweils ein Neutralisationsschritt. Dieser wird meist durch Inkubation des Harzes mit einer Lösung eines tertiärenamins (z.B. Triethylamin) ausgeführt. Nach dieser Behandlung und einigen Spülschritten kann die

Kupplung des nächsten Aminosäure-Derivats erfolgen.

1.2.1.5 Seitenkettenschutzgruppen

Ein wichtiger Punkt, welcher bei der Planung einer Peptidsynthese berücksichtigt werden muss, ist die Auswahl der geeigneten Seitenkettenschutzgruppen, resp. der geeigneten Aminosäure-Derivate. Von den 20 genetisch codierten und auch in der Peptidsynthese am häufigsten eingesetzten Aminosäuren müssen diejenigen, welche eine funktionelle Gruppe in der Seitenkette tragen, durch geeignete Massnahmen geschützt werden. Andernfalls muss im Verlaufe der Synthese mit irreversiblen Modifikationen dieser Gruppen oder mit Verzweigungen der Peptidketten gerechnet werden. Da diese Seitenkettenschutzgruppen während der gesamten Synthese an der funktionellen Gruppe verbleibenmüssen, spricht man in diesem Zusammenhang auch von permanenten Schutzgruppen.

Ueblicherweise werden die Seitenketten der folgenden Aminosäuren permanent geschützt: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Cystein, Threonin, Serin, Tyrosin, Histidin und Arginin. Gelegentlich werden auch Asparagin, Glutamin, Methionin und Tryptophan als geschützte Derivate eingesetzt.

In Bezug auf die chemische Stabilität gelten für die permanenten Schutzgruppen die gleichen Anforderungen, wie für die Verankerung der C-terminalen Aminosäure mit der Trägermatrix. Diese Bedingungen werden, bei Einsatz der Boc-Gruppe als temporäre α -Aminoschutzgruppe, durch Benzyl-Derivate erfüllt. Im allgemeinen handelt es sich bei diesen Derivaten um Benzylester, -ether oder -urethane. Ausnahmen sind die Derivate von Histidin und Arginin; Histidin wird üblicherweise als Imidazol-Tosyl-Derivat und Arginin als Guanidino-Nitro-Derivat eingesetzt. Neben den erwähnten existiert jedoch eine Vielzahl weiterer Seitenkettenschutzgruppen, welche je nach gewählter Synthesestrategie ebenfalls ihre Verwendung finden.

1.2.1.6 Abspaltung des Peptids vom Harz

Um schlussendlich das gewünschte freie Peptid zu erhalten, muss dieses von seinem Trägermaterial abgespalten werden. Gleichzeitig sollen auch die vorhandenen Seitenketten- Schutzgruppen entfernt werden. Da die gesamte Synthesestrategie der Boc-Methode auf der Anwendung mehr oder weniger säurelabiler Bindungen beruht, muss in diesem letzten Schritt das Peptid-Harz-Material mit starken organischen oder anorganischen Säuren behandelt werden. Von den verschiedenen denkbaren

Möglichkeiten hat sich eine Mischung von wasserfreiem Fluorwasserstoff (HF) mit Anisol als geeignet erwiesen. Das Anisol dient, wie schon bei der Acidolyse, als Kationenfänger, welcher die unter diesen Bedingungen aus den abgespaltenen Schutzgruppen entstehenden Kationen neutralisieren soll. Diese Kationen könnten andernfalls zu irreversiblen Modifikationen (Alkylierungen) verschiedener Aminosäure-Seitenketten führen.

Der bei der HF-Behandlung bei Serin- und Threoninresten auftretende N->O-Acyl-"Shift" lässt sich durch nachträgliche Behandlung des Peptids mit wässriger, leicht alkalischer Bicarbonatlösung problemlos wieder reversieren.

1.2.1.7 Schlussbemerkungen

Bei der Vielzahl der heute zur Verfügung stehenden Aminosäure-Derivate und Trägermaterialien sollte es möglich sein, eine Peptidsynthese optimal zu planen. Schwierigkeiten können jedoch nie vollständig ausgeschlossen werden, da immer mit sequenzspezifischen Problemen gerechnet werden muss. Häufig zeigen sich diese Probleme jedoch erst bei der Aufarbeitung und Reinigung des Peptid-Materials. Je nach Verwendungszweck des synthetisierten Peptids muss dann allenfalls der Aufwand für Reinigung des heterogenen Produkts gegen den Aufwand einer neuen Synthese mit veränderter Schutzgruppenstrategie abgewogen werden. Zusammenfassend ist aber zu sagen, dass beim heutigen Stand der Entwicklung Peptide mit Kettenlängen von 20 bis 30 Aminosäuren in guter Reinheit und Ausbeute synthetisiert werden können.

1.2.2 Automatisierung der chemischen Peptidsynthese

Betrachtet man das Ablaufschema einer Peptidsynthese (Abb. 10 und Tab. 3), so fällt sofort auf, dass sich das Prozedere, von kleinen Änderungen für einige Aminosäure-Derivate abgesehen, in jedem Zyklus wiederholt. Damit sind bei der Festphasen-Peptidsynthese nahezu ideale Voraussetzungen für eine teilweise oder vollständige Automatisierung gegeben. Dies führte dann, nachdem die Grundlagen der Synthese erarbeitet worden waren, sehr schnell zur Entwicklung solcher Automaten. Anfanglich waren dies, dem Stand der Technik entsprechend, noch relativ einfache Typen, mit mechanischer oder manueller Steuerung.

Mit dem Aufkommen der Mikroprozessor- und Mikrocomputer-Technik, sowie den enormen Fortschritten im Bereich der Elektronik (Integrierte Schaltungen, engl. IC) wurde es dann möglich, die gesamte Prozesssteuerung auf einen entsprechend konstruierten und programmierten Kleinrechner

zu übertragen. Neben der grösseren Zuverlässigkeit (weniger verschleissbelastete, mechanische Bauteile) gewinnt man mit der Computer-Steuerung vor allem auch an Flexibilität. So erfordert zum Beispiel eine Aenderung im Syntheschema im allgemeinen nicht mehr den Umbau einer Maschine ("Hardware"), sondern allenfalls noch das Anpassen der Steuerprogramme ("Software").

Heute werden von verschiedenen Firmen Peptid-Synthese-Automaten angeboten. Die Preisspanne erstreckt sich dabei über einen Bereich von ca. 20'000.- für die einfachsten, bis gegen 400'000.- Fr für die komfortabelsten Geräte.

Unter diesen Voraussetzungen wurde die Planung für den Eigenbau eines Peptidsynthese-Automaten in Angriff genommen. Ziel war es, mit möglichst kleinem finanziellem Aufwand (Grössenordnung der günstigsten käuflichen Geräte) ein möglichst komfortables und flexibles Gerät, welches sowohl mit der t-Butyloxycarbonyl (Boc)-, als auch mit der Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppenstrategie arbeitet, zu bauen.

Die beiden erwähnten Schutzgruppen-Strategien zeigen in ihrem technischen Ablauf keine wesentlichen Differenzen. Damit konnte das Anforderungsprofil für die Maschine anhand der in unserer Arbeitsgruppe häufiger eingesetzten Boc-Methode erstellt werden. Die Umstellung auf die Fmoc-Methode erfordert dann lediglich die geeignete Abänderung des Steuerprogramms, sowie den Austausch der Lösungsmittel und Reagenzien.

Als ersten Punkt galt es die Frage, inwieweit der gesamte Syntheseablauf automatisiert werden sollte, abzuklären (je höher der Automatisierungsgrad, desto höher natürlich auch der technische Aufwand).

Es musste also ein Kompromiss zwischen Aufwand und Nutzen gefunden werden. Dazu wurden alle Schritte innerhalb eines Synthesesyklus in Reaktions- und Spülschritte aufgeteilt. Für die Waschschritte, welche für die Qualität des Endprodukts eher sekundär, vom zeitlichen und manipulativen Aufwand her jedoch relativ umfangreich sind, ergeben sich bei der Automatisierung keine grossen Probleme. Es geht lediglich darum, die jeweils benötigten Volumina der verschiedenen Lösungsmittel mit genügender Reproduzierbarkeit in das Synthesegefäss zu pumpen und sie nach vorgegebener Zeit wieder aus dem Gefäss zu entfernen. Kritischer sind in dieser Hinsicht die Reaktionsschritte, handelt es sich doch bei den eingesetzten Reagenzien im allgemeinen um Gemische verschiedener Flüssigkeiten. Für diese musste zuerst die Frage nach der Stabilität abgeklärt werden. Immerhin kann es während einer automatischen Peptidsynthese durchaus vorkommen, dass diese Reagenzien über mehrere Stunden, eventuell sogar über mehrere Tage, bei Raumtemperatur aufbewahrt werden müssen. Die wohl eleganteste Lösung des Problems wäre, die Herstellung der Gemische, jeweils kurz vor deren Verwendung, durch die Maschine vornehmen zu lassen. Dies würde jedoch einen erheblichen technischen und konstruktiven Aufwand bedingen. Noch drastischer zeigt sich dieses Problem bei der Zugabe der Aminosäure-Derivate und, falls benötigt, des Kupplungsreagens, müssten doch in diesen Fällen Lösungsmittel- und Reagenzienvolumina in der Grössenordnung von einigen hundert Mikrolitern bis zu einigen zehn Millilitern mit hoher Präzision und Reproduzierbarkeit gehandhabt werden können. Desweiteren müssen die fest vorliegenden

Aminosäure-Derivate vollständig im geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und unter Vermeidung jeglicher Kontamination ins Synthesegefäß gebracht werden können.

Um derartigen Anforderungen gerecht werden zu können, ist mit einem sehr hohen technischen Aufwand zu rechnen. Dies würde natürlich auch entsprechende Kosten nach sich ziehen. Da aber für einen Prototyp zunächst auf einen derartigen Aufwand verzichtet werden sollte, wurde vorerst auf die Automatisierung der Aminosäure-Derivat- und Kupplungsreagens-Zugabe verzichtet. Damit war auch die Lösung für das Problem mit der Stabilität der Reagenslösungen gegeben. Unter normalen Umständen und unter Beibehaltung des bei der manuellen Synthese verwendeten Zeitplans lassen sich pro Tag ein bis zwei Synthesesyklen durchführen. Da die Zugabe der Aminosäure-Derivate und des Kupplungsreagens von einer Bedienungsperson übernommen wird, entfällt auch das Problem mit den Reagenslösungen, da diese dann jeweils von der Bedienungsperson frisch zubereitet werden können. Unter diesen Umständen ist mit einer maximalen Zeit von 15 bis 20 Stunden bis zum Verbrauch dieser Lösungen zu rechnen. Damit können negative Auswirkungen auf die Qualität des Endprodukts ausgeschlossen werden. Mit diesen Vorgaben wurde nun die technische Planung des Synthese-Automaten in Angriff genommen.

Da bei der Festphasen-Peptidsynthese alle Reaktions- und Waschschrte in demselben Reaktionsgefäß stattfinden, geht es im Prinzip lediglich darum, ein für die Dosierung und Förderung der Lösungsmittel und Reagenzien geeignetes Ventil- und Dosiersystem mit entsprechender Steuerung aufzubauen.

Aus Gründen der Uebersichtlichkeit wurde eine Unterteilung des Systems in eine elektronische (Steuerung) und eine mechanische (Ventile und Pumpen) Einheit vorgenommen. In Abbildung 11 ist der gewählte Aufbau des Ventil- und Dosiersystems schematisch dargestellt.

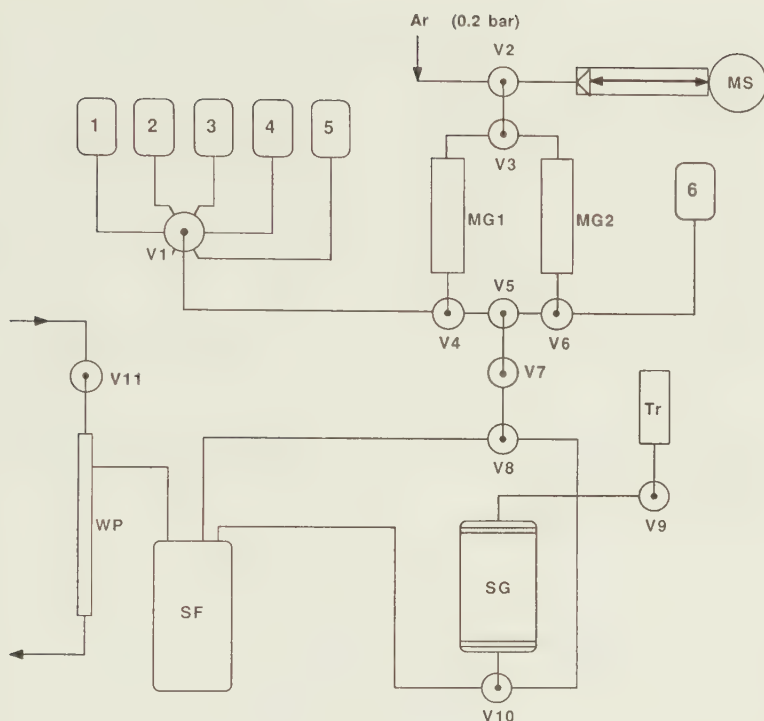


Abbildung 11: Schematischer Aufbau des Peptidsynthese-Automaten

Legende:

1, 2, 3, 4, 5, 6: Reagenzien- und Lösungsmittel-Behälter

V1 : 6-Weg-Ventil (pneumatisch)

V2 - V10 : 3-Weg-Ventile (pneumatisch)

V11 : Kühlwasserventil (elektrisch) zu Wasserstrahlpumpe

MS : Motorgetriebene Spritze (Schrittmotor)

MG1, MG2 : Messgefäße mit Schwimmern und Lichtschranke

SF : Saugflasche (Lösungsmittel-Abfallgefäß)

SG : Synthesergefäß mit motorgetriebenem Schüttler (Synchronmotor)

Tr : Trockenrohr

WP : Wasserstrahlpumpe mit Rückschlagventil

Grundlage der gesamten Steuereinheit ist ein Mikrocomputersystem vom Typ 6502 (Rockwell). Dieses relativ einfache und übersichtliche System erlaubt den Einbau zusätzlicher Ein-/Ausgabe-Bausteine, in diesem Falle sogenannte Ram-Input/Output-Timer- (RIOT)-Devices, welche mit Hilfe eines geeigneten "Interfaces" die direkte Ansteuerung und Kontrolle der Ventile und Motoren ermöglichen. Jeder dieser "RIOT" verfügt über 16, in 2 Gruppen (Ports) zusammengefasste Ein-/Ausgänge. Die Festlegung der Datenrichtung, d.h. die Definition der Anschlüsse als Ein- oder Ausgänge, geschieht programmässig durch Setzen der Datenrichtungsregister. Damit ist der Mikrocomputer in der Lage, Daten mit seiner "Umgebung" auszutauschen. Detaillierte Angaben zum eingesetzten Mikroprozessorsystem und zu den "RIOT" finden sich in den spezifischen Datenblättern (Rockwell, 1979; Rockwell, 1981) und in der Fachliteratur (z.B. Zaks, 1981; Zaks, 1983).

Zur Anpassung der externen Einheiten an das Leistungsvermögen der "RIOT" muss allerdings noch eine elektronische Puffer-, Logik- und Treiberstufe (Interface) eingefügt werden. Abbildung 12 zeigt das entsprechende Blockschema. Mit den heute zur Verfügung stehenden integrierten Leistungsschaltungen ("Power-IC") stellen sich für den Aufbau eines solchen Interface keine grossen Probleme mehr. Eine Uebersicht über die wichtigsten eingesetzten Bauteile findet sich im Kapitel Material und Methoden (Kap. 2.3.2) .

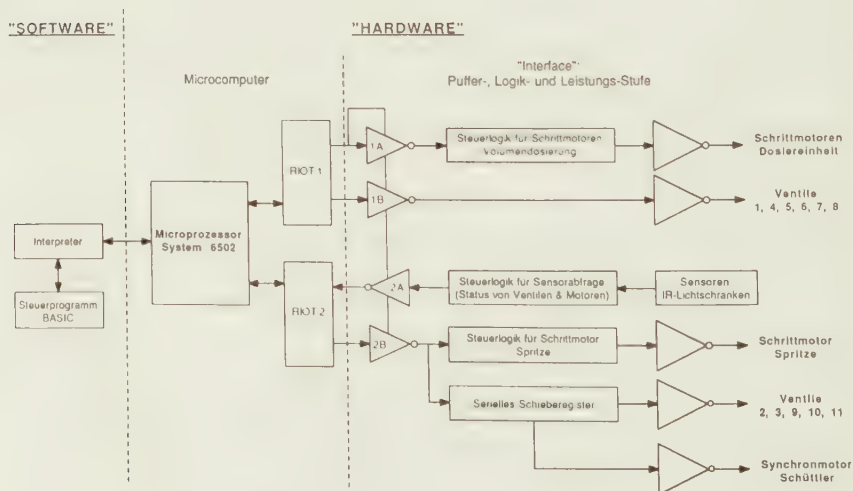


Abbildung 12: Blockschema des Steuersystems für den Synthese-Automaten (Elektronik)

1.3 ANTIKOERPER GEGEN SYNTHETISCHE PEPTIDE

Ein weiteres Einsatzgebiet synthetischer Peptide, welches in den letzten Jahren einen grossen Aufschwung gezeigt hat, ist die Anwendung solcher Peptide zur Erzeugung von Antikörpern. Das Hauptinteresse gilt dabei vor allem der Herstellung kreuzreagierender Antikörper. Diese erhält man, wenn das als Immunogen eingesetzte Peptid, zumindest zeitweise, gleiche oder ähnliche Konformationen einnimmt, wie das entsprechende Oberflächensegment des als Matrix dienenden Proteins. Eine bestimmte Population eines polyklonalen Antipeptid-Serums wird also sowohl das Peptid, wie auch das Protein als Antigen erkennen. Um derartige Antikörper effizient einsetzen zu können, ist man auf grösstmögliche Kreuzreaktivität angewiesen. Gleiches gilt prinzipiell auch für die Erzeugung monoklonaler Antikörper. Man wird auch hier nach dem Klon mit optimaler Kreuzreaktion, aber auch genügender Spezifität suchen müssen.

Die Erzeugung solcher Antikörper steht und fällt also mit den Möglichkeiten, Oberflächenbereiche einer Proteinstruktur zu erkennen. Häufig stehen jedoch nur die linearen Sequenzinformationen der zu untersuchenden Proteine, sei dies aus Protein- oder DNA-Sequenzierung, zur Verfügung. Aufgrund der Tatsache, dass Regionen eines Proteins aus mehreren Aminosäuren mit polaren Seitenketten nur an der Oberfläche auftreten können, wurden von mehreren Autoren Algorithmen zur Bestimmung dieser Oberflächensegmente aus den linearen Sequenzdaten publiziert (Hopp & Woods, 1983; Kyte & Doolittle, 1982; Pfaff et al., 1982). Untersuchungen zeigten, dass die Lage der antigenen Determinanten auf der Oberfläche des Proteins häufig sehr gut mit hydrophilen Sequenzregionen übereinstimmt. Einen Spezialfall stellt in dieser Beziehung die α -Helix-Struktur dar. Besitzt diese Helix eine hydrophobe, nach innen gewandte und eine hydrophile, dem wässrigen Lösungsmittel ausgesetzte Seite, so zeigt sich bei Betrachtung der linearen Sequenz ein wechselweises Auftreten von hydrophilen und hydrophoben Aminosäurepaaren. Die Analyse nach den Methoden von Hopp und Woods (Hopp & Woods, 1983) oder Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) liefert in diesem Falle nur unbefriedigende Resultate, da bei beiden Algorithmen ein durchschnittlicher Hydrophilizitäts-, resp. Hydropathizitätswert über mehrere Aminosäurereste (6-9 Reste) ermittelt wird. Bei der Methode von Pfaff et al. (Pfaff et al., 1982) wird versucht, die Sekundärstruktur (α -helicale Segmente) zu ermitteln und dann die Oberflächensegmente der Helices anhand der Helix-Rad-Darstellung zu evaluieren. Die Anwendbarkeit dieser Methode wurde von den Autoren in verschiedenen Experimenten bestätigt.

Mit dem zur Verfügung stehenden Methodenarsenal sollte es also möglich sein, mit Hilfe synthetischer Peptide auch gegen unbekannte, respektive nur in ihrer DNA-Sequenz bekannte Proteine spezifische Antikörper zu erzeugen.

Dabei ist allenfalls zu berücksichtigen, dass Peptide aus weniger als 15-20 Aminosäureresten im allgemeinen erst nach Kupplung an ein Trägerprotein eine immunogene Wirkung zeigen. Grössere Peptide werden üblicherweise direkt als Antigen eingesetzt, dies mit dem Vorteil, dass keine

Anti-Trägerprotein-Antikörper, welche den Nachweis der Anti- Peptid-Antikörper stören können, gebildet werden. Häufig sind synthetische Peptide, oder Konjugate solcher Peptide mit Trägerproteinen sogar bessere Immunogene als die entsprechenden antigenen Determinanten des nativen Proteins. Durch Immunisierung erhält man im Idealfall somit Antikörper mit höherer Affinität und Spezifität. Mit der Verwendung synthetischer Peptide als Antigene oder Haptene sind auch Möglichkeiten für die Erzeugung von Antikörpern gegen Strukturen, die im nativen Protein keine Determinante bilden, gegeben. Dieser Umstand interessiert vor allem aus medizinischen und immunologischen Gründen, liessen sich doch mit dieser Methode eventuell auch potente Impfstoffe gegen Viren, welche ihre antigenen Determinanten ständig verändern (Influenza-, Polio-, Hepatitisviren etc.), herstellen.

Eine Uebersicht zum Einsatz synthetischer Peptide zur Erzeugung von Antikörpern findet sich im Artikel von Walter und Doolittle (Walter & Doolittle, 1983).

1.3.1 Antikörper gegen das DDT-bindende Polypeptid

Für die Erzeugung von Antikörpern gegen konstruierte, in der Natur nicht vorkommende Peptide spielen obige Betrachtungen, zumindest vorerst nur eine untergeordnete Rolle. Es bleibt lediglich abzuklären, ob das Peptid für sich schon antigene Wirkung zeigt, oder ob es "nur" als Hapten eingesetzt und demzufolge an ein Trägerprotein gekuppelt werden muss.

Aufgrund der chemisch-physikalischen Eigenschaften des DDT-bindenden Polypeptids (Hydrophobizität und Aggregationsverhalten) (Moser et al., 1983), war zu erwarten, dass das Peptid, in Kombination mit einem Adjuvans direkt als Antigen eingesetzt werden kann. Endgültige Klarheit konnte jedoch erst das Experiment (Immunisierung und Nachweis der Antikörper) bringen.

Geplantes Hauptanwendungsgebiet solcher Anti-DBP-Antikörper wäre, neben strukturellen Untersuchungen, deren Einsatz als empfindliches Nachweisinstrument für das Expressionsprodukt des in *Escherichia coli* klonierten synthetischen DBP Gens (Moser, 1986). Weitere Untersuchungen betreffen hauptsächlich die immunogenen Eigenschaften und die Verteilung der antigenen Determinanten auf dem Peptid.

1.4 ANTIKOERPER GEGEN DDT

DDT, weltweit bekanntes Akronym der Verbindung 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethan (Dichlor-Diphenyl-Trichlorethan) (Abb. 13) und eines der wohl am meisten eingesetzten und am weitesten verbreiteten Insektizide wurde schon im Jahre 1874 von O. Zeidler erstmals synthetisiert. Die insektizide Wirkung der durch Kondensation von 2 Mol Chlorbenzol mit 1 Mol Trichloracetaldehyd (Chloral) in Schwefelsäure gebildeten Verbindung wurde jedoch erst Ende der dreissiger Jahre vom Basler Chemiker Paul Müller entdeckt.

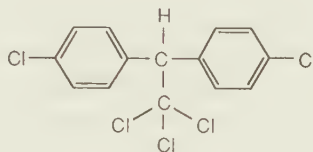


Abbildung 13: 4,4'-DDT

In der Folge wurde DDT im Massstab von tausenden von Tonnen produziert und eingesetzt. Nach der ersten Euphorie über die bis dahin unerreichten Resultate in der Schädlingsbekämpfung wurden jedoch schon bald die ersten kritischen Stimmen laut. Im Verlaufe der sechziger und siebziger Jahre wurde dann die Anwendung von DDT, zumindest in der westlichen Welt stark eingeschränkt oder sogar verboten. Als Gründe für diese Beschränkung sind unter anderen die schon sehr früh beobachtete Resistenzentwicklung einiger Insektenarten, die grosse Unspezifität im Wirkungsspektrum, aber auch die enorme Beständigkeit des Gifts gegenüber natürlichen Abbauprozessen anzuführen. Mit diesen Problemen stellt sich auch die Frage nach den ökologischen und gesundheitlichen Folgen des extensiven Einsatzes von DDT (und anderen Insektiziden). So wurden beispielsweise in Tieren aus der Antarktis, einem Gebiet, in dem DDT nie angewendet worden ist, signifikante Mengen des Insektizids nachgewiesen (Centeno et al., 1970). In anderen Arbeiten, allerdings aus dem Jahre 1962, bei der Untersuchung von menschlichem Fettgewebe, wurden durchschnittliche Mengen von 12 ppm bestimmt. Sogar Werte von 648 ppm, dies entspricht 648 mg pro Kilogramm Körperfett, konnten in einzelnen Testpersonen nachgewiesen werden (Hayes, 1962). Derartige Daten stimmen umso nachdenklicher, je mehr man sich der Tatsache, dass diese

Kontamination nicht nur Einzelne, sondern die gesamte Natur betrifft, bewusst wird. Hinzu kommt, dass DDT und andere Insektizide bei weitem nicht die einzigen, von Menschenhand geschaffenen Umweltgifte sind. Entsprechende Meldungen über die Belastung der Natur mit Polychlorierten Biphenylen (PCB's, z.B. Dioxin), Schwermetallen, radioaktiven Abfällen etc sind auch häufig in der Tagespresse zu finden. Neben all den Problemen die der Einsatz synthetischer, aber auch natürlicher Insektizide mit sich bringt, dürfen die enormen Fortschritte, die im Bereich der Nahrungsmittelproduktion (Schädlingsbekämpfung) und Seuchebekämpfung (z.B. Malaria) erreicht worden sind, nicht unerwähnt bleiben. So konnten, dank DDT, Millionen von Menschen, vor allem in der Dritten Welt, vor Hunger und Seuchentod gerettet werden (WHO, 1979). Dies ist, neben finanziellen Erwägungen (DDT ist gegenüber vergleichbaren Pestiziden bis zu 10 mal billiger) mit ein Grund, weshalb dieses Insektizid in diesen Regionen immer noch, respektive wieder in vermehrtem Masse eingesetzt wird.

All die oben nur ansatzweise erwähnten positiven und negativen Aspekte des DDT-Einsatzes, sowie weitere Zusammenhänge ausführlicher zu besprechen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Es muss deshalb auf entsprechende Fachliteratur verwiesen werden (WHO, 1979; Fishbein, 1976). An dieser Stelle soll lediglich auf die mit unserem Projekt in näherem Zusammenhang stehenden Fragen noch etwas detaillierter eingegangen werden.

Aufgrund seiner speziellen chemischen und physikalischen Eigenschaften zeigt sich DDT als eine gegenüber Witterungseinflüssen, Sonnenbestrahlung oder mikrobiellem Abbau sehr resistente Verbindung. Als Halbwertszeiten in der Natur werden Werte von 10 bis 30 Jahren angegeben. Zusammen mit dem relativen Löslichkeitsverhalten in Wasser und apolaren Medien führt dies zu einer signifikanten Akkumulation des Gifts im Verlauf der Nahrungskette. Auf diesem Wege ist wohl nahezu jeder Organismus schon mit DDT in Kontakt gekommen. Innerhalb des Organismus wird die stark lipophile Substanz präferentiell in die hydrophoben, biologischen Membranen aufgenommen und entzieht sich damit einer schnellen Metabolisierung im Stoffwechsel. Untersuchungen über die Entgiftungsmechanismen in verschiedenen Organismen (Bakterien, Insekten, Säuger) ergeben ein ganzes Spektrum verschiedener DDT-Derivate (siehe WHO, 1979). Die Umwandlung in das wesentlich weniger toxische 1,1-Dichlor-2,2-bis(p-chlorophenyl-ethylen) (DDE) durch das Enzym DDT-Dehydrochlorinase dürfte einer der Gründe für die Resistenzentwicklung zahlreicher Insekten sein.

Im menschlichen Organismus wurden hauptsächlich oxidative Metabolisierungsreaktionen, mit 2,2 Bis (p chlorophenyl)-essigsäure (DDA) oder DDA-Konjugaten als Endprodukten beobachtet. Mit Arbeiten in unserem Laboratorium wurde versucht, derartige Abbaureaktionen auf ein Modellsystem zu übertragen. Aufgrund von Beobachtungen, wonach die Biotransformation vieler Xenobiotika von Cytochrom P-450-Enzymen mit Häm als prosthetischer Gruppe bewirkt wird, wurde ein auf der katalytischen Wirkung von Häm (resp. Häm) basierendes "In vitro DDT-Abbausystem" untersucht (Langen, 1984; Epprecht, 1985; Linden, 1986). Einige der in natürlichen Abbauprozessen

nachgewiesenen Derivate (DDD, DDE, DDA; siehe auch Abbildung 14) konnten auch in diesem System gefunden und identifiziert werden.

Ueber den Wirkungsmechanismus von DDT in Insekten ist, trotz nun bald 50-jähriger Anwendung des Insektizids, nur sehr wenig bekannt. Arbeiten zu diesem Thema unterstützen Hypothesen, welche der Verbindung eine neurotoxische Wirkung zusprechen. Durch den Einbau in biologische Membranen wird vermutlich eine Störung der für die Neurotransmission essentiellen Membranpotentiale hervorgerufen. Die schnelle Reaktion der Insekten auf DDT-Kontamination spricht ebenfalls für diese Hypothese. Daneben werden aber auch noch weitere Wirkungen, wie z.B. Hemmung der Chitin-Biosynthese, diskutiert.

Analog zur insektiziden Wirkung, liegen auch über die Auswirkungen von DDT auf Säuger, trotz zahlreicher Arbeiten zu diesem Thema, nur wenige gesicherte Daten vor. Einig ist man sich jedoch darüber, dass die akut toxische Wirkung relativ gering ist. In Experimenten mit Ratten lag die LD_{50} bei oraler Verabreichung in der Grössenordnung von 150 bis 300 mg pro Kilogramm. Extrapoliert man diesen Wert auf das durchschnittliche Körpergewicht eines Menschen, so läge die Letaldosis in einem Bereich von über 20 Gramm.

Die Folgen der Langzeitbelastung des Organismus (infolge Akkumulation) mit kleinen DDT-Mengen sind noch nahezu unbekannt. In einzelnen Fällen wurden der Verbindung, sowie einigen Metaboliten (vor allem DDE) kanzerogene, teratogene und mutagene Wirkungen zugeschrieben.

In Zusammenhang mit der geplanten Erzeugung von Anti-DDT-Antikörpern sind Beobachtungen, die von Allergieentwicklung und Hautaffektionen, hervorgerufen durch DDT, sprechen (siehe in Centeno et al., 1970) von speziellem Interesse. Ob allerdings die allergische Reaktion direkt auf DDT zurückgeführt werden kann, ist zumindest fragwürdig, da Substanzen mit Molekularmassen von weniger als 1000 Dalton im allgemeinen keine immunogene Wirkung zeigen (Erlanger, 1980). Diesem Befund widersprechen auch Daten aus anderen Untersuchungen, welche dem DDT sogar eine immunsuppressive Wirkung zuschreiben (WHO, 1979).

1.4.1 Erzeugung von Anti-DDT-Antikörpern

Wie oben schon erwähnt kann bei der Applikation niedermolekularer Substanzen (<1000 d) im allgemeinen nicht mit der Bildung von entsprechenden Antikörpern gerechnet werden. Der mit solchen körperfremden Substanzen konfrontierte Organismus versucht diese, meist über den Weg der Biotransformation, via Leber oder Niere wieder auszuschcheiden. Um trotzdem Antikörper gegen derartige Haptenmoleküle zu erzeugen, müssen diese mit höhermolekularen Trägern (Proteine, synthetische Polypeptide) konjugiert werden (Erlanger, 1980). Viele neuere Erkenntnisse über Immunogenität, Struktur von antigenen Determinanten und Antikörpern (Grösse der Bindungsstelle,

biologische Eigenschaften etc.) wurden mit Hilfe solcher Konjugate gewonnen. Mit der Entwicklung der Radio-Immuno-Assay-Technik (Berson & Yalow , 1971) führte dies zu einer enormen Verbreitung immunologischer Methoden in medizinischen und biologischen Forschungsrichtungen.

Für die Herstellung von Hapten-Protein-Konjugaten steht heute ein grosses Methodenarsenal zur Verfügung (Erlanger, 1980). Damit können gegen nahezu jedes Haptenmolekül spezifische Antikörper erzeugt werden. Gerade DDT bietet aber in dieser Hinsicht einige Schwierigkeiten. Das Hauptproblem liegt wiederum bei der grossen chemischen Stabilität des Moleküls. Es weist keine, für eine Konjugation geeigneten funktionellen Gruppen (Amino-, Sulfhydryl-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppen) auf, und Versuche, solche direkt einzuführen scheinen wenig erfolgversprechend. Hingegen stehen, zumindest theoretisch, zahlreiche DDT-Derivate, mit entsprechenden funktionellen Gruppen zur Verfügung. DDA wurde für derartige Zwecke schon von mehreren Arbeitsgruppen, offenbar mit unterschiedlichem Erfolg, eingesetzt (Centeno et al., 1970, Haas & Guardia, 1968, Furuya & Urasawa, 1981). Furuya und Urasawa reinigten und charakterisierten Antikörper, die durch Immunisierung von Kaninchen mit DDA-Serumalbumin (DDA-BSA) erhalten wurden. Weiter konnten für die gereinigten Immunoglobulin G-Fractionen Unterschiede in der Spezifität für verschiedene DDT-Derivate nachgewiesen werden.

In Zusammenhang mit der Konstruktion, Charakterisierung und eventueller Optimierung des künstlichen DDT-bindenden Polypeptids ist die Frage nach der Struktur eines natürlichen Pendant von grossem Interesse. Die Kenntnis der Struktur der Antigen-Bindungsstelle eines Anti-DDT-Antikörpers, d.h. eines spezifisch den 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethyl-Rest bindenden Proteinsegments, könnte in diesem Kontext zahlreiche neue Informationen zum Struktur-Funktions-Fragenkomplex bringen. Idealerweise sollten also mehrere monoklonale Antikörper unterschiedlicher Spezifität und Affinität zur Verfügung stehen. Aus dem Vergleich solcher Antikörper untereinander und gegenüber dem künstlichen DDT-bindenden Polypeptid sind zahlreiche Hinweise für spätere Konstruktionen oder Verbesserungen von künstlichen, biologisch aktiven Modellpeptiden zu erwarten.

Hauptproblem für die Erzeugung derartiger Antikörper ist jedoch die Verfügbarkeit geeigneter DDT Derivate, kann doch DDT selbst, wie schon erwähnt, nicht direkt als Hapten oder Antigen eingesetzt werden. Kelthan (DDT OH) verfügt als einziges der in Abbildung 14 aufgeführten und kommerziell erhältlichen Derivate sowohl über eine funktionelle, wie auch über die aus strukturellen Aspekten wichtige Trichloromethyl-Gruppe.

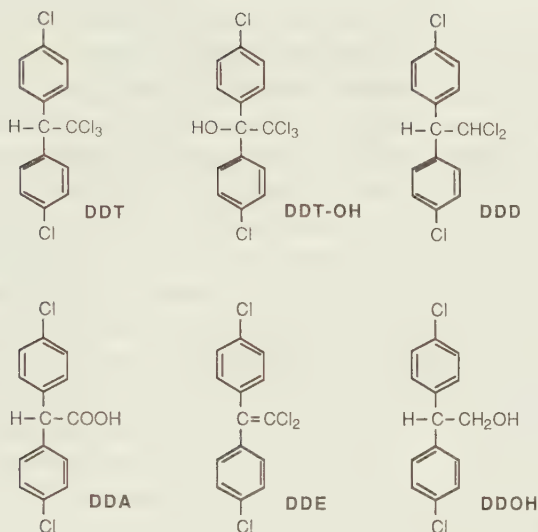


Abbildung 14: Beispiele kommerziell erhältlicher DDT-Derivate:

DDT	= 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethan
DDT-OH	= 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethanol
DDA	= 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-essigsäure
DDOH	= 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-ethanol
DDE	= 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-1,1-dichlorethylen
DDD	= 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-1,1-dichlorethan

Ein Vergleich der räumlichen Strukturen und der Kalottenmodelle (Van-der-Waals-Radien) der diversen DDT- Derivate zeigt, dass die Anwesenheit dieser Trichloromethylgruppe zu einer signifikanten Veränderung der sterischen Verhältnisse in den Molekülen führt. Dieser Umstand könnte sich dann auch auf die Spezifität der zu erzeugenden Antikörper auswirken. Interessant sind unter diesen Aspekten auch Beobachtungen, dass der Trichlormethyl-Rest für die insektizide Wirkung von DDT und DDT-OH offenbar essentiell ist. Alle anderen Derivate zeigen eine wesentlich geringere Toxizität und wurden deshalb auch nur in geringem Umfang als Pestizide eingesetzt. DDT-OH ist im Vergleich zu DDT wesentlich weniger stabil. So tritt schon unter leicht alkalischen Bedingungen eine Chloroformelimination unter Bildung von p,p'-Dichlorobenzophenon auf. Diese Instabilität ist auf das

Ausführlichere Diskussionen der "Ritter-Reaktion", sowie der damit in Zusammenhang stehenden Nitril-Chemie finden sich in den Uebersichtsartikeln von Krimen und Cota (Krimen & Cota, 1969) und Schaefer (Schaefer, 1970).

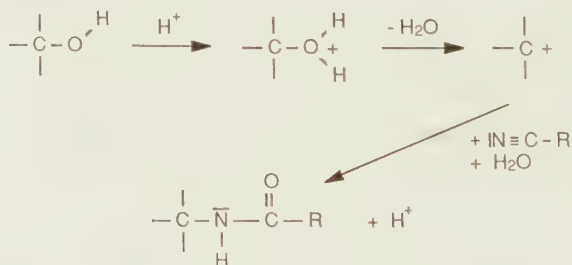


Abbildung 15: Prinzip der "Ritter-Reaktion"

30

1980) zeigten, dass auf diese Weise erzeugte Anti-Hapten-Antikörper eine gegenüber dem Hapten erhöhte Spezifität aufweisen. Neben dem eben erwähnten "Spacer" sind noch einige weitere Aspekte, wie Wahl des Trägerproteins, Epitopdichte und chemische Möglichkeiten der Konjugation für eine optimale Immunisierung mit Hapten-Protein-Konjugaten zu berücksichtigen.

Von den verschiedenen in Frage kommenden Trägerproteinen werden Serumalbumine verschiedener Spezies am häufigsten eingesetzt. Daneben finden jedoch auch Ovalbumin, Globulin-Fraktionen, Hämocyanine, Thyroglobulin und Fibrinogen ihre Anwendung. Neben den immunogenen Eigenschaften der erwähnten Proteinfractionen, ist vor allem das Löslichkeitsverhalten der Proteine und der entsprechenden Konjugate für die Wahl des geeigneten Trägers ausschlaggebend. Speziell bei radioimmunologischen oder enzymgekoppelten Nachweismethoden ist eine gute Wasserlöslichkeit von Vorteil. Serumalbumine, welche für sich zwar nicht als sehr gute Immunogene gelten, zeigen sich in dieser Hinsicht als ideale Trägerproteine, da sie sowohl als Protein wie auch als Konjugat häufig auch noch in wässrigen Puffern und in Gemischen dieser Puffer mit organischen Lösungsmitteln gut löslich sind.

Die Wahl der optimalen Epitopdichte, d.h. der Anzahl Haptenmoleküle pro Proteinmolekül, beeinflusst, in Abhängigkeit vom chemisch-physikalischen Charakter des Haptens sowohl Löslichkeit, wie auch Immunogenität des Konjugats. Daneben spielen für eine optimale Besetzung auch die Eigenschaften des Proteinmoleküls, respektive dessen Aminosäurezusammensetzung eine wichtige Rolle. Die Zahl der für eine Kupplung verfügbaren, funktionellen Aminosäure-Seitenketten bestimmt dann auch hauptsächlich die zur Anwendung kommende Kupplungsmethode. Chemisch relativ einfach zugänglich sind, via N-Acylierung, die ϵ -Aminogruppen der Lysinreste und der N-Terminus des Proteins. Üblicherweise werden dabei Haptene mit Carboxylgruppen (aktiviert als gemischte Anhydride, mit Carbodiimiden oder als Aktivester) eingesetzt. Daneben existieren aber auch für Haptene mit anderen funktionellen Gruppen (Amino-, Hydroxyl-, Sulfhydrylgruppen) noch zahlreiche weitere Kupplungsmöglichkeiten (Erlanger, 1980). Nach erfolgter Kupplung bleibt meist noch die Charakterisierung der erhaltenen Konjugate. Auch hier existieren naturgemäss wieder mehrere Möglichkeiten, von denen der spektroskopische Nachweis, der Einbau radioaktiver Markierungen oder die Bestimmung nicht gekuppelter, funktioneller Gruppen, die am häufigsten angewendeten sind.

Zur Immunisierung der Tiere wird das Konjugat meist als Emulsion einer wässrigen Lösung oder Suspension mit Adjuvantien injiziert. Ueber die optimale Injektionstechnik liegen verschiedene Ansichten vor, hauptsächlich werden aber intradermale, subcutane oder intramuskuläre Injektionen an einer oder mehreren Stellen verabreicht. Die Verstärkung der Immunantwort durch zeitlich gestaffelte, weitere Injektionen ("Booster") des Antigens ist jedoch allgemein anerkannt.

Schlussendlich folgt noch der Nachweis und die Charakterisierung der gegen das Konjugat gebildeten Antikörper. Die Kupplung des Haptens an ein Trägerprotein bringt es mit sich, dass neben den spezifischen Anti-Hapten-Antikörpern auch Anti-Protein-Antikörper gebildet werden. Diese müssen, da sie den Nachweis der gewünschten, spezifischen Antikörper massiv beeinflussen können,

entweder durch Neutralisation mit dem Trägerprotein oder durch Abtrennung mittels Affinitätschromatographie eliminiert werden. Weitergehende Untersuchungen an den spezifischen Anti-Hapten-Antikörpern erfordern deren Isolierung aus dem Gesamtserum. Mit den heute für derartige Probleme zur Verfügung stehenden Isolationstechniken stellen sich in dieser Hinsicht normalerweise keine grösseren Probleme mehr. Die Anwendung von affinitätschromatographischen Methoden dürfte dabei, neben den herkömmlichen Techniken (Fällung, Ionenaustauschchromatographie etc.), das Mittel der Wahl sein. Furuya und Urasawa (Furuya & Urasawa, 1981) konnten auf diese Weise spezifische Anti-DDA-Antikörper isolieren und charakterisieren.

In Zusammenhang mit der Konstruktion des DDT-bindenden Polypeptids, stellt jedoch ein entsprechendes Anti-DDT-Antiserum nur den ersten Schritt in Richtung eines natürlichen DDT-bindenden Proteins dar. Ein polyklonales Serum ist, wie der Name schon sagt, auch nach der Isolation der spezifischen Antikörper, stets ein Gemisch diverser, DDT-bindender Antikörper. Für Studien der DDT-Bindungsstelle(n) von natürlichen, bindenden Proteinen heisst dies, dass in weiteren Schritten versucht werden muss, einen oder mehrere monoklonale Antikörper zu erzeugen. Erst mit diesen wird es allenfalls möglich sein, gewinnbringende, neue Erkenntnisse über strukturelle und funktionelle Aspekte für die Konstruktion aktiver, künstlicher Polypeptide zu gewinnen.

MATERIAL UND METHODEN

2.1 PEPTIDSYNTHESE

Die für die Peptidsynthese eingesetzten t-Butyloxycarbonyl-Aminosäurederivate wurden bei Bachem (Bubendorf) bezogen. Als Trägermaterial wurde das chloromethylierte Polystyrolharz der Firma BioRad (BioBeads SX1, 200-400 mesh) verwendet. Lieferanten und Qualität der übrigen für die Peptidsynthese verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel können der folgenden Tabelle entnommen werden.

- a) Dichlormethan (Methylenchlorid) zur Analyse, stabilisiert mit ca. 20 ppm 2-Methylbuten (Merck)
- b) Ethanol puriss. p.a. absolut, Ph.Helv. (Fluka)
- c) N,N-Dimethylformamid (DMF) puriss. p.a., (Fluka) aufbewahrt über Molekularsieb
- d) Trifluoressigsäure (TFA) purum (Fluka) vor Gebrauch destilliert
- e) Triethylamin puriss. p.a. (Fluka) vor Gebrauch destilliert
- f) Anisol (Methoxybenzol) purum (Fluka) vor Gebrauch destilliert
- g) 2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol) puriss. p.a. (Fluka) vor Gebrauch destilliert
- h) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) puriss (Fluka)

Tabelle 1: Verzeichnis der Chemikalien für die Peptidsynthese

2.1.1 Synthese von Thr¹⁵, Thr¹⁷-DBP und Trp¹⁶-DBP

Beide Analoga weisen im C-terminalen Teil der Aminosäurekette eine zum Original-DBP identische Sequenz auf. Somit konnten die Reste Phenylalanin 24 bis Prolin 18 in einem gemeinsamen Ansatz gekuppelt werden.

2.1.1.1 Kupplung der C-terminalen Aminosäure

Die Veresterung der C-terminalen Aminosäure Phenylalanin mit dem chloromethylierten Polystyrolharz wurde nach der von Gisin (Gisin, 1973) beschriebenen Methode ausgeführt. Das hierzu benötigte Cäsiumsalz wird durch Titration der Boc-Aminosäure mit einer wässrigen Cäsium-carbonat- oder -bicarbonat-Lösung erhalten. Der Ansatz sah in diesem Falle folgendermassen aus:

Eine Lösung von 420 mg (1.585 mMol) Boc-Phenylalanin in 7.5 ml Ethanol und 2.5 ml Wasser wurde mit einer 20%-igen wässrigen Cäsiumbicarbonatlösung bis zu einem pH-Wert von 7.0 titriert. Anschliessend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der salzartige Rückstand je 5 mal mit Benzol versetzt und wieder eingetrocknet. Um allfällige Spuren der Lösungsmittel zu entfernen, wurde das Salz über Nacht unter Hochvakuum im Exsikkator aufbewahrt. Für die eigentliche Veresterung wurden 602 mg (1.517 mMol) Boc-Phenylalanin- Cäsiumsalz in 35 ml DMF gelöst und 5.1 g (= 6.53 meq Chloromethyl-Gruppen) Polystyrolharz hinzugefügt. Das Ganze wurde, mit einem Trockenrohr versehen, während 16 Stunden bei 50°C leicht gerührt. Die Aufarbeitung des Aminosäure-Polystyrolharzes umfasste folgende Schritte:

- 1.) Waschen des Harzes mit DMF/H₂O = 9/1
- 2.) Waschen des Harzes mit DMF
- 3.) Waschen des Harzes mit Ethanol
- 4.) Trocknen des gewaschenen Harzes unter Hochvakuum

Zur Bestimmung der Kupplungsausbeute wurden 2 Aliquote des Boc-Phenylalanin-Harzes in einer Mischung von konzentrierter Salzsäure/Propionsäure = 1/1 für 4 Stunden bei 145°C hydrolysiert. Nach Abdestillieren des Sauregemisches wurde der Rückstand mit Probenpuffer für die Aminosäureanalyse extrahiert und auf einem Biotronik LC 6001 Aminosäure-Analysator auf den Phenylalanin Gehalt analysiert. Als Mittelwert der beiden Bestimmungen ergab sich eine Konzentration von 0.105 mMol Phenylalanin pro Gramm Harz. Mit Hilfe dieses Wertes wurden nun die benötigten Mengen der verschiedenen Aminosäure-Derivate, sowie die für den Kupplungsschritt einzusetzenden Volumina der DCC Stammlösung (0.25 g DCC/ml Methylenchlorid) berechnet.

2.1.1.2 Ausführung der Synthese-Zyklen

Zur Synthese der beiden Analoga wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Boc-Aminosäure-Derivate eingesetzt.

t-Boc-Threonin-(O-Benzyl)	1. & 22. Kupplungszyklus
t-Boc-Isoleucin x 0.5 H ₂ O	2.,3.,4. & 20 Kupplungszyklus
t-Boc-Asparagin-(p-nitrophenylester)	5.,11. & 17. Kupplungszyklus
t-Boc Prolin	6. & 18. Kupplungszyklus
t-Boc-Tyrosin-(O-2,6-Dichlorbenzyl)	7. & 9. Kupplungszyklus (Trp-Analogon)
t-Boc-Threonin-(O-Benzyl)	7. & 9. Kupplungszyklus (Thr-Analogon)
t-Boc-Histidin-(im-Tosyl)	8. Kupplungszyklus (Thr-Analogon)
t-Boc-Phenylalanin	10. & 21. Kupplungszyklus
t-Boc-Serin-(O-Benzyl)	12. Kupplungszyklus
t-Boc-Methionin	13. & 23. Kupplungszyklus
t-Boc-Alanin	14. Kupplungszyklus
t-Boc-Glycin	15. Kupplungszyklus
t-Boc-Valin	16. Kupplungszyklus
t-Boc-Arginin-(G-Nitro)	19. Kupplungszyklus
t-Boc-Tryptophan	8. Kupplungszyklus (Trp-Analogon)

Tabelle 2: Verzeichnis der zur Synthese verwendeten Boc-Aminosäure-Derivate

Für den Start der Synthese wurde das Reaktionsgefäß des Peptidsynthese-Automaten mit 4.5 g des trockenen Boc-Phe-Harzes beschickt. Nach zweimaligem Quellen und Schrumpfen des Harzes in Methylenchlorid und Ethanol wurde das Steuerprogramm gestartet. Detaillierte Angaben zum Programm und über den Aufbau des Synthese-Automaten finden sich in den Kapiteln 1.2.2 und 2.2. An dieser Stelle soll lediglich der zeitliche Ablauf der einzelnen Schritte innerhalb eines Kupplungszyklus besprochen werden.

Tabelle 3 zeigt das Ablaufschema:

<u>Schritt</u>	<u>Anzahl und Dauer</u>
1) Spülen: Methylenchlorid	2 x 2 Min.
2) Acidolyse: 40% TFA in Methylenchlorid	1 x 1 & 1 x 20 Min.
3) Spülen: Methylenchlorid	1 x 1 & 5 x 2 Min
4) Neutralisation: 10% Triethylamin in Methylenchlorid	1 x 1 & 1 x 6 Min
5) Spülen: Methylenchlorid	1 x 1 & 5 x 2 Min
5*) Spülen: Methylenchlorid	1 x 1 & 2 x 2 Min
Spülen: DMF	3 x 2 Min
6) Aminosäure-Derivat; Inkubation	1 x 10 Min
7) DCC-Zugabe; Kupplung	> 3 Stunden
7*) Kupplung von p-Nitrophenylester-Derivaten	> 6 Stunden
8) Spülen: Methylenchlorid	3 x 2 Min
8*) Spülen: DMF	3 x 2 Min
9) Spülen: Ethanol	2 x 2 Min
10) Spülen: Methylenchlorid	1 x 1 & 5 x 2 Min
10*) Spülen: Methylenchlorid	1 x 1 & 2 x 2 Min
Spülen: DMF	3 x 2 Min

Für die üblicherweise ausgeführte 2. Kupplung werden die Schritte 6) bis 10) wiederholt.

Bemerkungen:

- zu 2): Nach Kupplung von Methionin wird in allen folgenden Zyklen für die Acidolyse eine Lösung von 40% TFA, 10% Anisol in CH_2Cl_2 (v/v/v) eingesetzt. Nach Kupplung von Tryptophan werden zusätzlich 2% β -Mercaptoethanol (v/v) zugefügt.
- zu 5*), 8*), 7*), 10*) Diese Schritte werden ausgeführt, falls ein p-Nitrophenylester-Derivat (Asn- bzw. Gln-Derivat) zur Kupplung eingesetzt wird.

Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf eines Peptidsynthese-Zyklus

Die Derivate der basischen Aminosäuren und von Tryptophan wurden zur Kupplung jeweils in möglichst kleinen Volumina (ca. 0.5 ml) DMF vorgelöst und dann in CH_2Cl_2 aufgenommen. Die p-Nitrophenylester-Derivate wurden zur Kupplung in DMF gelöst.

Nach 6 Zyklen wurde das Peptidharz mit CH_2Cl_2 , Ethanol und Methanol aus dem Synthesegefäß in eine Glasfritte gespült, mit obigen Lösungsmitteln gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Zur Kontrolle wurden 2 Aliquote des Harzes hydrolysiert (konz. HCl /Propionsäure, 1/1 (v/v), 4 h, 145°C) und analysiert. Die Analyse ergab die erwarteten Resultate und die Synthese konnte fortgesetzt werden.

Ab diesem Punkt musste nun die Synthese der Analoga einzeln weitergeführt werden. Im folgenden werden jedoch Synthese, Harzabspaltung und Aufarbeitung der Peptide gemeinsam besprochen, da von kleineren Ausnahmen abgesehen, die angewendeten Methoden identisch waren.

Die eingesetzten Hexapeptid-Harz-Mengen betrugen 2.2 g für das Thr¹⁵,Thr¹⁷-Analogon und 2.5 g für das Trp¹⁶-Analogon. In beiden Fällen wurden die restlichen 17 Kupplungszyklen nach dem in Tabelle 3 dargestellten Ablauf mit Hilfe des Synthese-Automaten durchgeführt. Analysen der Peptidharze wurden in beiden Fällen nach erfolgter Kupplung des Alanin-Derivats ausgeführt. Am Ende der Synthese wurden die Peptid-Harze wiederum aus dem Synthesegefäß gespült, gewaschen und getrocknet.

2.1.1.3 HF-Spaltung der Peptid-Harze

Die Acidolyse der C-terminalen Esterbindung der Peptide zum Polystyrolharz, sowie der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte in flüssigem HF bei 0°C . Zum Schutz der Peptide gegen Alkylierung durch unter diesen Bedingungen aus den Schutzgruppen entstehende Carbokationen wurden je 2.5 ml Anisol und beim Tryptophan-Analogon noch zusätzlich 100 mg freies Tryptophan zugegeben. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurden HF und flüchtige Nebenprodukte abdestilliert und die Peptide mit 1M Essigsäure aus dem Rückstand extrahiert (für das Trp¹⁶-Peptid musste zusätzlich noch 50%-ige Essigsäure (v/v, in Wasser) verwendet werden, da das ölige Rohprodukt in der 1M Essigsäure nur schlecht löslich war) und lyophilisiert.

2.1.1.4 N->O-Acylshift-Reversierung

Bei Peptiden, welche in ihrer Sequenz Serin- und/oder Threonin-Reste enthalten, kann unter den stark sauren Bedingungen der Abspaltung ein N->O-Acylshift auftreten. Dieser kann durch einfache Inkubation der Peptide in wässriger Bicarbonatlösung (leicht alkalisch) problemlos wieder rückgängig gemacht werden.

Wie schon das ursprüngliche DDT-bindende Polypeptid (Moser, 1986), zeigten auch die beiden Analoga eine schlechte Löslichkeit in wässrigen, alkalischen Lösungen. Aus diesem Grund wurde bei beiden Peptidsuspensionen (in 50 mM NH_4HCO_3 , pH = 7.7) solange Harnstoff zugegeben, bis eine klare Lösung entstand. Nach 6-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden die Peptid-Harnstofflösungen für 24 Stunden gegen insgesamt je 40 Liter 50 mM NH_4HCO_3 , pH = 7.7 dialysiert. Der Dialyseschlauch (Union Carbide) war vorgängig in Natriumbicarbonat-Lösung und destilliertem Wasser ausgekocht worden. Die anschliessende Lyophilisation ergab die Peptid-Rohprodukte der beiden Synthesen.

2.2 REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER PEPTIDE

Neben den beiden synthetisierten Analoga wurden im Rahmen dieser Arbeit auch das Original-Peptid (DBP) und das Val¹⁴-Analogon verwendet. Diverse Fraktionen des DBP wurden von B.Gutte, R. Moser und H.Langen und das Val¹⁴-Peptid von M. Linden zur Verfügung gestellt (Moser et al., 1983; Linden, 1986).

2.2.1 Chromatographie

2.2.1.1 Gelfiltration

In einem ersten Reinigungsschritt wurden sämtliche Peptid-Rohprodukte, zur Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen auf einer Sephadex G-50 (Pharmacia) Säule (92 x 2.2 cm) in 1 M Essigsäure chromatographiert. Aufgetragen wurde jeweils der durch Zentrifugation auf einer Sorvall RC 5B (SS-34, 17-20'000 rpm, 20 Min., 4°C) erhaltene, klare Ueberstand aus 100 bis 200 mg Rohpeptid in 5 ml 1 M Essigsäure.

Zur weiteren Reinigung und Charakterisierung wurden, aufgrund der Aminosäureanalysen, nur die im Säulenausschlussvolumen eluierenden, hochmolekularen Fraktionen verwendet.

Für den Nachweis des Gleichgewichts zwischen den polymeren Aggregaten und den monomeren Formen der Peptide, wurden die Monomer-Fraktionen, nach Lyophilisation, in 1 M Essigsäure aufgenommen, für 6 bis 12 Stunden inkubiert und anschliessend wiederum auf obiger Säule chromatographiert.

Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der Analoga Thr¹⁵, Thr¹⁷-DBP und Trp¹⁶-DBP wurden Mengen von 20 - 50 mg dieser Peptide auf eine Sephacryl S-300-Säule (Pharmacia) (1.5 x 120 cm) in 1 M Essigsäure aufgetragen und chromatographiert. Als Massenreferenzen wurden Dextran-blau, Rinderserumalbumin, Carboanhydrase und freies Tryptophan eingesetzt.

2.2.1.2 "Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography" (RP-HPLC)

RP-HPLC wurde zur weiteren analytischen und präparativen Darstellung, sowie zur Bestimmung der Homogenität der diversen Peptid-Fraktionen nach der G-50-Chromatographie eingesetzt. Folgende System kamen dabei zur Anwendung:

Geräte:

- A) -Kontron Programmer Modell 200
 - 2 Altex Solvent Metering Pumps Modell 110 A
 - Rheodyne Injection Valve 7125 (20, 100, 500 µl loop)
 - Kontron Uvikon Spectrophotometer 725 (8 µl flow through cell)
 - W+W 600 Tarkan Recorder
- B) - LKB 2152 Controller
 - 2 LKB 2150 HPLC Pumps
 - Rheodyne Injection Valve 7125 (20, 100, 500 µl loop)
 - LKB 2151 Variable Wavelength Monitor (10 µl flow through cell)
 - LKB 2210 Potentiometric Recorder

Säulen:

- A) Aquapore RP-300 Cartridge System mit Vorsäule (300 Å, 10 mm, 250 x 4,6 mm, Brownlee Labs)
- B) Aquapore RP-300 Semipreparative Column (300 Å, 10 mm, 250 x 10 mm, Brownlee Labs)
- C) Nucleosil NS-300 5C8 (300 Å, 5 mm, 300 x 4 mm, Macherey-Nagel)

Lösungsmittel:

Systeme:

- A) A: 0.1% TFA in H₂O (v/v)
B: 100% Acetonitril
- B) A: 0.1% TFA, 10% Acetonitril in H₂O (v/v/v)
B: 0.1% TFA, 75% Acetonitril in H₂O

Für die Herstellung der Lösungen wurde quartz-bidestilliertes Wasser verwendet. Die Trifluoressigsäure (purum, Fluka) war vorgängig destilliert worden, und das Acetonitril (für HPLC) stammte ebenfalls von Fluka.

Neben diesen hauptsächlich eingesetzten Lösungsmittel-Systemen wurden auch Versuche (Optimierung von Trennung und Ausbeute) mit folgenden Puffer-Systemen durchgeführt:

A: 2.5 mM Triethylammoniumformiat pH 4.0

B: 2.5 mM Triethylammoniumformiat pH 4.0, 60% Acetonitril (v/v)

A: 5 mM Triethylammoniumtrifluoracetat pH 2.5

B: 5 mM Triethylammoniumtrifluoracetat pH 2.5, 60% Acetonitril (v/v)

A: 0.1% Phosphorsäure, 10 mM NaClO₄

B: 0.1% Phosphorsäure, 10 mM NaClO₄, 60% Acetonitril (v/v)

A: 25 mM Tris-HCl pH 7.0

B: 25 mM Tris-HCl pH 7.0, 60% Acetonitril (v/v)

Alle Peptid-Proben wurden zur Injektion jeweils im Lösungsmittel A aufgenommen und kurz abzentrifugiert (Eppendorf Modell 5412). Zur präparativen Isolation, für Hydrolysen zur Aminosäureanalyse, zur Sequenzbestimmung etc. wurden pyrolysierte Glasröhrchen verwendet. Das Abdestillieren der Lösungsmittel erfolgte entweder am Rotationsverdampfer oder im Speed Vac Concentrator.

Für analytische RP-HPLC-Läufe wurden Peptidmengen in der Größenordnung von 50-100 mg und zur präparativen Isolation der beiden HPLC-Fractionen des DBP (D1, D2) wurden Peptidmengen von bis zu 1mg pro Chromatographie-Lauf eingesetzt. Durch Mehrfachinjektionen konnten grössere Mengen der einzelnen Fractionen gewonnen werden. Diese wurden durch Rechromatographie auf ihre Homogenität überprüft.

2.2.2 Analytische Charakterisierung

2.2.2.1 Aminosäureanalysen

Peptid- und Proteinhydrolysen wurden unter Vakuum ($p < 0.05$ Torr) mit destillierter Salzsäure (5.7 N) oder in einem Gemisch dest. Salzsäure/Thioglykolsäure (93/7, (v/v)) bei 110°C durchgeführt. Bei Verwendung des Thioglykolsäure-HCl-Gemisches wurde dieses jeweils nicht direkt zu den Proben, sondern nur in die äussere Ampulle zugegeben. Die Hydrolysezeiten variierten zwischen 24 und 72 Stunden. Die Analysen der aufgearbeiteten und geeignet verdünnten Hydrolysate erfolgten auf einem Biotronik LC 6001 Aminosäureanalysator oder auf einem für Fluoreszenzdetektion modifizierten Kontron Chromakon System.

2.2.2.2 Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure an den beiden mit RP-HPLC isolierten DBP-Fractionen (D1, D2) wurde durch Derivatisierung des N-Terminus mit Dansylchlorid (5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfochlorid, Fluka) und anschließende Kurzhydrolyse in destillierter HCl durchgeführt. Der Nachweis erfolgte dünnschichtchromatographisch (Hartley, 1970) mit einem ebenfalls dansylierten Aminosäure-Standard (Hamilton) als Referenz.

2.2.2.3 Enzymatische Verdauung des N-Terminus

Der enzymatische Nachweis der N-terminalen Aminosäuren an den beiden RP-HPLC- DBP-Fractionen umfasste den Abbau der Peptide mit Aminopeptidase M (Röhm) und die Auftrennung der daraus erhaltenen Produkte auf dem Aminosäureanalysator. Die Reaktionsansätze sahen wie folgt aus. Ca. 50 nMol Peptid wurden in 0.2 M N-Methylmorpholin-Acetat-Puffer (pH 8.5, 2 mM $MgCl_2$) gelöst. Nach Entnahme eines Referenz-Aliquots wurden 80 mg Aminopeptidase M (in 1 mM HCl) zugegeben und der Ansatz bei 37°C inkubiert. Die in regelmässigen Zeitabständen entnommenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff gefroren, lyophilisiert und anschliessend analysiert.

2.2.2.4 Enzymatische Verdauung des C-Terminus

Der Nachweis der C terminalen Aminosäuren durch Verdauung mit Carboxypeptidase Y (Boehringer) wurde, in 0.2 M N-Methylmorpholin- Acetat-Puffer (pH 6.5), nach dem für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren beschriebenen Vorgehen durchgeführt.

2.2.2.5 Sequenzierung

Um allfällige, mit Aminosäureanalyse und enzymatischer Verdauung nicht detektierbare Unterschiede zwischen den beiden nach RP-HPLC-Reinigung erhaltenen Fractionen des DBP (D1,D2) nachzuweisen, wurden diese vollständig sequenziert.

Jeweils 50 bis 100 nMol der entsprechenden Peptidfractionen (DBP1, DBP2) wurden auf dem HPLC-System rechromatographiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden die Proben zur

Blockierung der N-terminalen Aminosäure in 1 ml Pyridin/Wasser (1/1, (v/v)) aufgenommen, mit 200 µl Phenylisothiocyanat (Fluka) versetzt und dann unter Stickstoff während 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Reagens wurde die Lösung anschliessend 3 mal mit ca. 5 ml Heptan/Essigsäureethylester (2/1, (v/v)) extrahiert und dann lyophilisiert. Die derart vorbereiteten Peptidfraktionen wurden nach Aktivierung der C-terminalen Carboxylgruppe mit 1-Ethyl-3-dimethylaminopropyl-carbodiimid (EDC; Fluka) an Aminopropylglas (Pierce, 75Å) gekuppelt (Salnikow et al., 1981; Salnikow et al., 1982). Ein Aliquot des gewaschenen Peptid-Glasmaterials wurde zur Bestimmung der Kupplungsausbeute in destillierter HCl bei 110°C für 48 Stunden hydrolysiert, danach im Exsikkator über NaOH-Plättchen getrocknet und die Aminosäuren mit Probenauftragspuffer extrahiert. Aus der anschliessenden Aminosäureanalyse wurde die für eine Sequenzierung (3-5 nMol) benötigte Peptid-Glas-Menge berechnet.

Der schrittweise Edman-Abbau erfolgte auf einem für Mikrosequenzierung mit 4-Dimethylamino-azobenzol-4'-isothiocyanat (DABITC) modifizierten LKB 4020 Solidphase Sequenator (Wilson et al., 1980). Die manuell konvertierten Proben wurden dünnschichtchromatographisch (Wilson et al., 1979) und mittels RP-HPLC (Chang, 1981) analysiert.

2.2.3 Bestimmung der Peptid-DDT-Dissoziationskonstanten

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Peptid-DDT-Komplexe wurde nach der Methode von Hummel und Dreyer (Hummel & Dreyer, 1962) ausgeführt.

Da sowohl DDT, als auch die Peptide in wässrigen Puffern sehr schlecht löslich sind, wurde ein Gemisch aus 50 mM NH_4HCO_3 /Ethanol (1/1, (v/v)) als Lösungsmittel eingesetzt. DDT wurde in einer Konzentration von 50 mMol/l zugegeben. Herkömmliche Gelmaterialien zeigen unter diesen Lösungsmittelbedingungen nur eine beschränkte Quellfähigkeit und eine dementsprechend schlechte Trennleistung. Deshalb wurde eine, speziell für die Chromatographie in organischen Lösungsmitteln konzipierte Sepharose-Matrix eingesetzt (LH-20 Sephadex, Pharmacia). Die Ausmasse der mit einem Wasserbad (25°C) thermostatisierten Säule betrugen 0.9 x 100 cm. Zur Überprüfung der vollständigen Einstellung des Gleichgewichts wurden alle Peptide auf einer verkürzten Säule (0.9 x 33 cm) mit dem obigen Lösungsmittelsystem chromatographiert.

Für die genaue Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden alle Peptide (hochmolekulare Fraktion nach G-50-Chromatographie) mehrfach auf der längeren Säule chromatographiert. Die Elutionsprofile bei den Wellenlängen 237 nm und 276 nm (278 nm beim Trp¹⁶-Analogon), sowie Absorptionsspektren der Peptide und des DDT wurden auf einem Kontron Uvikon 810/820 Spektrophotometer ausgemessen.

Anhand der durch die Peptide bewirkten Absorptionsdifferenz bei 237 nm und dem

Extinktionskoeffizienten von DDT ($\epsilon_{\text{mM},237\text{nm}} = 18.62$), sowie den mit Aminosäureanalysen bestimmten Peptidkonzentrationen, wurden die apparenten Dissoziationskonstanten berechnet. Versuche, die durch die Peptide gebundenen zusätzlichen DDT-Mengen mittels HPLC zu bestimmen, mussten wegen der zu geringen Reproduzierbarkeit der chromatographischen Ausbeuten wieder aufgegeben werden.

2.2.4 Circular dichroismus (CD)

Die Circular dichroismus-Messungen am DBP und den 3 Analoga (Thr¹⁵, Thr¹⁷-DBP, Trp¹⁶-DBP, 14-Val-DBP) wurden in Quarzküvetten (Schichtdicke 0.1-10 mm) auf einem JASCO-J-500C Spektropolarimeter durchgeführt. Zur Auswertung und Aufbereitung der Spektren für die graphische Darstellung wurde ein mit dem Spektropolarimeter gekoppelter "Personal-Computer" (Epson QX10, Bausch & Lomb Plotter, Programme von H. Willner) eingesetzt. Die gemessenen Spektren wurden nach Subtraktion der Lösungsmittel-Nullwerte für die Darstellung der "Mean Residue Ellipticity" (Q) umgerechnet. Die dazu benötigte mittlere Molmasse pro Aminosäure-Rest wurde anhand der theoretischen, mittels Aminosäureanalysen bestätigten Aminosäurezusammensetzungen berechnet.

Für die CD-Messungen wurden jeweils die hochmolekularen Fraktionen (nach G-50-Chromatographie) der Peptide verwendet. Als Lösungsmittel wurde, wie schon zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten, ein Gemisch aus 50 mM NH_4HCO_3 /Ethanol (1/1, (v/v)) eingesetzt. Die Peptide liegen in diesem Lösungsmittel, wie Moser (Moser, 1986) zeigte, jedoch nicht mehr als Aggregate, sondern in monomerer Form vor. Die Aufbereitung der Peptidlösungen umfasste Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier B-15), Zentrifugation (Sorvall RC 5B, SS-34, 20'000 rpm, 20 Min) und Mikrofiltration (Millipore Millex GS). Die Peptidkonzentrationen wurden aminosäureanalytisch bestimmt.

2.2.5 UV-Absorptionsspektren

Die UV-Absorptionsspektren der 4 Peptide wurden mit den für die CD-Messungen eingesetzten Lösungen auf einem Kontron Uvikon 810/820 Spektrophotometer aufgenommen. Die Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte mit Hilfe der bekannten Peptidkonzentrationen.

2.3 BAU DES PEPTIDSYNTHESE-AUTOMATEN

Wie schon im einleitenden Kapitel 1.2.2 erwähnt, wurde für Planung und Bau des Synthese-Automaten eine Auftrennung in einen mechanischen Teil (Ventile, Motoren etc) und einen elektronischen Steuerteil (Computer und elektronische Schaltungen (Interface)) vorgenommen.

2.3.1 Mechanischer Aufbau

Hier sind, naturgemäss sehr viele Möglichkeiten für die Ausgestaltung eines entsprechenden Ventil- und Pumpensystems vorhanden. Abbildung 11 (Kap. 1.2.2) zeigt das Schema der schlussendlich gewählten Version.

Zu erwähnen ist dabei das separate Leitungs- und Dosiersystem für die bei der Boc-Synthesestrategie eingesetzte 40%-ige Trifluoressigsäure-Lösung (Gefäss 6, Abb. 10). Alle übrigen Lösungsmittel und Reagentien werden über ein zweites derartiges System ins Synthesegefäss befördert. Andernfalls wäre, nach Informationen von Benutzern kommerziell erhältlicher Automaten, mit einer gegenseitigen Kontamination der Trifluoressigsäure- und Triethylamin-Lösung zu rechnen. Die verwendeten 3-Weg-Ventile ermöglichen es, bei jedem Lösungsmittelwechsel die entsprechenden Ventile mit dem nachfolgenden Lösungsmittel durchzuspülen und mit Argon auszublasen. Damit sollte eine Kontamination zwischen den verschiedenen Lösungen vermieden werden können.

Ein relativ kritischer Punkt ist die Dosierung der Lösungsmittel. In einer ersten Version der Apparatur wurden diese mit Hilfe einer Spritze, angetrieben durch einen Schrittmotor, via kleine Vorratsbehälter in das Synthesegefäss gepumpt. Da sowohl absolute Dosierung, wie auch Reproduzierbarkeit, trotz konstantem Spritzenhub, ausserhalb der noch tolerierbaren Grenzen lagen, musste dieses System geeignet modifiziert werden. Die Ungenauigkeiten dürften hauptsächlich auf die unterschiedlichen Dichten, Dampfdrücke und gegenseitigen Löslichkeiten der Lösungsmittel und Reagentien zurückzuführen sein. Um Probleme dieser Art auszuschalten, mussten Möglichkeiten zur direkten Messung der Volumina gefunden werden. Zum Erfolg führte schliesslich ein optisches System (Abb. 16), welches den Lösungsmittelpegel in einem Messgefäss, mit Hilfe eines Schwimmers, abtastet. Durch Verschieben der ausserhalb der Messgefässe angebrachten Lichtschranken kann das gewünschte Volumen beliebig variiert werden.



Abbildung 16: Optisches Lösungsmittel-Dosiersystem des Peptidsynthese- Automaten

Das Absaugen der nicht mehr benötigten Lösungsmittel und Reagentien aus dem Synthesegefäss geschieht mit Hilfe einer ventilgesteuerten Wasserstrahlpumpe. Die in einer Saugflasche gesammelten Abfälle können dann entsprechend entsorgt werden.

Bei der Gestaltung des Synthesegefässes mussten ebenfalls einige wichtige Punkte berücksichtigt werden. Neben einer geeigneten Konstruktion für die Gewährleistung der optimalen Durchmischung des Harzes mit den Lösungen mussten auch einfach zu handhabende Anschlüsse für das Zuführen und Absaugen der Lösungsmittel eingeplant werden.

Einfüllen und Entfernen des Harzes, sowie Zugabe der Aminosäure-Derivate und des Kupplungsreagens können über den seitlich angebrachten Schliffansatz vorgenommen werden. Abbildung 17 zeigt das durch die Glasbläserei der Chemischen Institute der Universität Zürich hergestellte Synthesegefäss

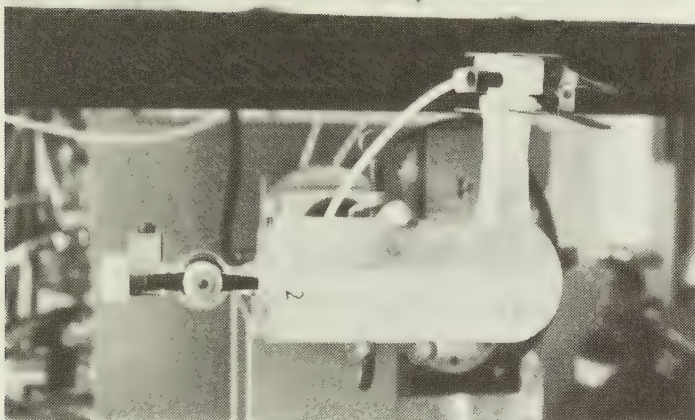


Abbildung 17: Synthesegefäß des Peptidsynthese-Automaten

Da sich das mechanische Schütteln des Synthesegefäßes bei der manuellen Festkörper-Peptidsynthese bewährt hat, wurde dies beibehalten. Der Antrieb erfolgt durch einen untersetzten Synchronmotor über einen verstellbaren Exzenter. Damit lässt sich der Schüttelwinkel des Gefäßes innerhalb eines gewissen Bereiches variieren. Die Positionierung des Synthesegefäßes für das Zuführen und Absaugen der Lösungsmittel wird wiederum optisch mit Infrarot-Gabellichtschranken durchgeführt.

Der mechanische Aufbau gestaltete sich relativ einfach. Es galt lediglich die Baugruppen (Synthesegefäß-Schüttler, Lösungsmittel-Ventile, elektropneumatische Ventile, Dosiersystem und Lösungsmittelpumpe) in geeigneter Anordnung in einem Gehäuse zu installieren und untereinander zu verbinden. Tabelle 4 gibt einen Ueberblick über die wichtigsten verwendeten Bauteile.

- Lösungsmittelventile:	Rheodyne 3-way slider valves, Model 5302 (5300) Rheodyne 6-port rotatory valve
- Elektropneumatische Ventile zu Lösungsmittelventilen:	SMC Model SA 251B (21-26 V DC)
- Volumendosiersystem:	Einweg Infrarot Lichtschranke Balluff (BLS 12-N-1, BLE 12-NS-1) 2 Schrittmotoren zur Positionierung der Lichtschranke 2 Glasgefäße mit Teflonschwimmern und PTFE-Anschlüssen (0.25 ")
- Lösungsmittelpumpe:	50 ml Gas Syringe Glenco Schrittmotor für Antrieb der Spritze, über Gewindestange
- Schüttlereinheit:	220 V Synchronmotor BAUR mit Untersetzungsgetriebe 10/125
- Lösungsmittelschläuche	PTFE-Schläuche (OD = 3 mm, ID = 1.5 oder 2 mm) mit Polyethylenfittings
- diverses Kleinmaterial	

Tabelle 4: Mechanische Bauteile für den Synthese-Automaten

Zahlreiche weitere wichtige Arbeiten, wie z.B. Konstruktion des Spritzenantriebs, Aufbau der Lösungsmitteldosiereinheit, Herstellung von Teflonstopfen und Synthesegefäßanschlüssen und Anfertigung von Gehäusen wurden von der Werkstatt des Biochemischen Instituts (B. van Wieringen und F. van Wieringen) ausgeführt.

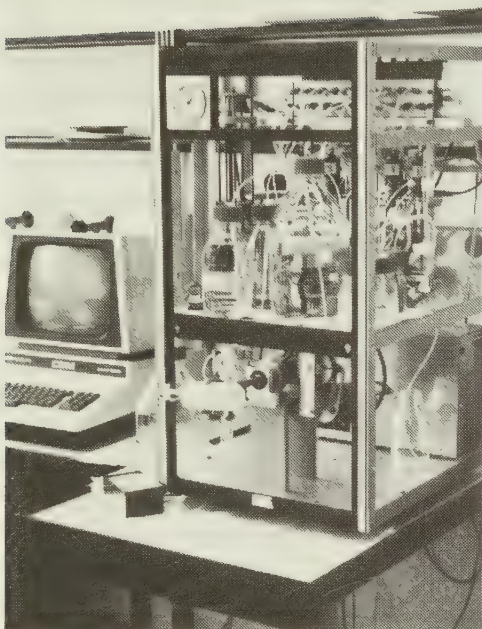


Abbildung 18: Ansicht des betriebsbereiten Peptidsynthese-Automaten

2.3.2 Steuerung und Elektronik

Wie schon in der Einleitung erwähnt, steht mit dem Microcomputer ein nahezu ideales und sehr flexibles Gerät für die Ablaufsteuerung zur Verfügung. Eingesetzt wurde ein CBM 8032 (Commodore). Um Programme und Synthesedaten abzuspeichern und auszudrucken, wurden zusätzlich ein Disketten-Doppellaufwerk Commodore 8250 und ein Matrixdrucker Commodore CBM 8023P angeschafft.

Die Modifikation des Microcomputers umfasste lediglich den Einbau der 2 zusätzlichen Ein-/Ausgabe-Bausteine. Da der Computer auf der 6502-Zentraleinheit (CPU) basiert, wurden die sogenannten RAM-Input-Output-Timer (RIOT)-Bausteine des Typs 6532 im geeigneten

Adressbereich (\$9800, \$A800 hexadezimal) der CPU installiert. Diese RIOT's gestatten es unter anderem, periphere Einheiten (Ventile, Motoren, Relais etc) über ein entsprechendes Interface direkt anzusteuern. Von den 4 "Ports" wurden 3 als Ausgänge und 1 als Eingang definiert, d.h. es stehen somit 24 (3 x 8) direkt programmierbare Ausgänge und 8 (1 x 8) Eingänge zur Verfügung.

Mit Ausnahme der beiden RIOT's und der Sensorelemente wurde die gesamte elektronische Steuerung und Stromversorgung auf Lochrasterplatinen aufgebaut. Die schon bei der Planung vorgenommene Aufteilung in verschiedene Baugruppen wurde nach Möglichkeit beibehalten. Auf einer Grundplatine, welche die elektrischen Verbindungen zwischen den einzelnen Baugruppen herstellt, wurden insgesamt 5 Platinen (Puffer- und Inverterstufe, Netzteil-, Anzeige-, Logik- und Treiberstufe und Sensorauswerte-Platine) mit Hilfe von Steckverbindern montiert.

- | | |
|------------------------------|--|
| - Ein-/Ausgabe-Bausteine: | - RAM, I/O, Interval Timer Device (RIOT) Typ R6532 (Rockwell) |
| - Puffer- und Inverterstufe: | - TTL: 74LS125 (Tri-State Bus Leistungstreiber)
74LS04 (Hex Inverter) |
| - Logik- und Treiberstufe: | - ULN 2001A
(High Voltage, High Current Darlington Transistor Arrays)
- UCN 4823 A (BiMOS 8-Bit Serial-Input, Latched Drivers)
- UCN 4202 A (Stepper Motor Translator/Driver) |
| - Sensorstufe: | - Infrarot-Gabellichtschranken (GE H21A2)
- TTL: 74LS154 (4 to 16 Line Decoder)
74LS93 (4-Bit Binary Counter)
74LS04 (Hex Inverter) |
| - Netzteil: | - Optokoppler SFH 600-2
- Ringkern-Transformator 220/36 Volt 180VA
- Gleichrichter
- DC-DC-Schaltregler |

Neben diesen wichtigsten aktiven Bauelementen wurden noch zahlreiche Widerstände, Kondensatoren, Transistoren, Dioden und Leuchtdioden etc eingesetzt.

Tabelle 5: Verzeichnis der wichtigsten elektronischen Bauteile für die Steuerung des Synthese-Automaten.

Die Infrarot-Gabellichtschranken zur Erfassung des Schaltzustandes von Ventilen, zur Feststellung der Synthesegefäßsposition und der Spritzenstellung wurden bei den jeweiligen Einheiten installiert. Alle integrierten Schaltungen (IC's) wurden auf entsprechenden Sockeln installiert. Dies ermöglicht im Störfall ein einfaches und schnelles Austauschen dieser Bauteile. In Tabelle 5 sind die wichtigsten verwendeten elektronischen Bauteile aufgeführt.

2.3.3 Steuerprogramm

Der zur Steuerung der Synthesemaschine verwendete Microcomputer kann mit Hilfe eines in nicht löschbaren Speichern (Read Only Memory, ROM) untergebrachten Interpreters (Uebersetzungsprogramm) in der Sprache BASIC programmiert werden.

Das gesamte Steuerprogramm wurde, wiederum aus Gründen der Uebersichtlichkeit und einfacheren Modifizierbarkeit, in mehrere unabhängige, auf Disketten abgespeicherte Unterprogramme aufgeteilt. In Abbildung 19 ist diese Aufteilung schematisch dargestellt.

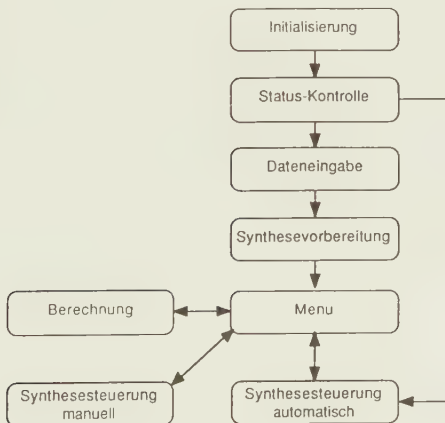


Abbildung 19: Schema des Steuerprogramms für den Peptidsynthese-Automaten. Die Pfeile zeigen die gegenseitigen Aufrufmöglichkeiten der Unterprogramme

Die Funktion der einzelnen Programmblöcke soll im folgenden kurz besprochen werden.

Nach dem Einschalten des Systems wird durch den Start-Befehl automatisch das erste Programm von der Diskette in den Programmspeicher des Microcomputers geladen und ausgeführt. Diese Initialisierungsroutine bringt das gesamte System in einen definierten Zustand (Setzen der Datenrichtungsregister in den RIOT's; Aktivierung des Interface, Definition der Ventil- und Motorenstellungen, Entleeren der Lösungsmittelschläuche etc.). Zum Schluss ruft diese Routine das Kontrollprogramm auf. Dieses überprüft den Synthese-Status, indem die Diskette auf das Vorhandensein der für die Synthese benötigten Daten abgefragt wird. Stellt das Kontrollprogramm einen Unterbruch im Syntheseablauf (Stromausfall, manuell herbeigeführter Unterbruch) fest, so wird direkt das eigentliche Synthesesteuerprogramm aufgerufen. Andernfalls, also bei Neubeginn einer Synthese folgen das Dateneingabe- und Synthesevorbereitungs-Programm. Hier müssen die benötigten Synthesedaten wie Anzahl der Zyklen, Sequenz des Peptids, gewünschte Lösungsmittelvolumina, Konzentration der C-terminalen Aminosäure auf dem Harz etc. eingegeben werden. Nach Kontrolle der eingegebenen Werte werden auf der Diskette die Dateien mit den aufbereiteten Synthesedaten erzeugt. Das folgende Menu-Programm erlaubt die Auswahl verschiedener weiterer Unterprogramme. Das Programm Berechnung berechnet aus den Synthesedaten die benötigten Mengen an Aminosäure-Derivaten, Reagenzien und Lösungsmittel für die gesamte Synthese. Diese Werte werden als Protokoll auf dem Drucker ausgegeben. Mit dem Volumen-Programm kann jederzeit das pro Schritt geförderte Lösungsmittelvolumen verändert werden. Schlussendlich folgt noch das eigentliche Synthesesteuerprogramm. Dieses übernimmt die gesamte Steuerung und Kontrolle der Ventile und Antriebsmotoren im Synthese-Automaten. Zudem wird der Synthesestatus (Zyklus- und Schrittnummern, sowie weitere wichtige Daten) auf der Diskette protokolliert. Damit besteht die Möglichkeit, dass das System nach einer Störung (Stromausfall etc) selbständig mit der Ausführung des nächsten Schrittes weiterfährt. Da Aminosäure-Derivate und, falls nötig, Kupplungsreagens manuell zugegeben werden, unterbricht das Programm jeweils vor den entsprechenden Schritten den Syntheseablauf. Nach Zugabe der Reagentien durch die Bedienungsperson fährt das Programm mit der Ausführung der nächsten Schritte weiter. Nach Beendigung der Synthese kann das Peptidharz dem Synthesegefäß entnommen und weiter aufgearbeitet werden.

2.4 ERZEUGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER ANTI-DBP-ANTIKÖRPER

Zur Erzeugung polyklonaler Antikörper gegen das DDT-bindende Polypeptid wurden insgesamt 3 Kaninchen eingesetzt. Vor Beginn der Immunisierung wurde, zur Gewinnung der Präimmunseren, jedem Tier ca. 5 bis 10 ml Blut aus der Ohrvene entnommen.

Um allfällige Unterschiede im immunologischen Verhalten der hochmolekularen und der monomeren Fraktionen (nach G-50-Chromatographie) festzustellen, wurden 2 Kaninchen mit dem aggregierten und ein weiteres mit dem monomeren Peptidmaterial immunisiert. Die 1. Injektion von ca. 50-100 µg Peptid wurde als Emulsion aus je 0.5 ml komplettem Freund'schem Adjuvans (Difco) und physiologischem Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline, PBS pH 7.2) intramuskulär verabreicht. Die Immunisierung wurde durch monatliche Injektionen der "Booster"-dosen (je ca. 30-60 µg Peptid in inkomplettem Freund'schem Adjuvans (Difco)/PBS (1/1)) fortgesetzt. Jeweils 2-3 Wochen nach jeder Injektion erfolgte die Abnahme von Probeblut. Die Seren wurden, nach vollständiger Gerinnung des Blutes (4°C, über Nacht), durch Zentrifugation vom Blutkuchen abgetrennt und, falls nicht sofort weiterverwendet, portioniert und tiefgefroren.

Der Nachweis der Anti-Peptid-Antikörper wurde mit der Immunpräzipitations- und der Radioimmunassay-Methode durchgeführt. Die von Prof. H.Binz (Institut für Immunologie und Virologie, Universität Zürich) ausgeführten Immunpräzipitationsexperimente zeigten jedoch durchwegs negative Resultate. Diese sind vermutlich auf die geringe Löslichkeit der Peptide in wässrigen Pufferlösungen zurückzuführen.

Dieselben Schwierigkeiten zeigten sich auch bei der Ausführung der Festphasen-Radioimmun-Tests. In einer Testserie mit verschiedenen Gemischen aus PBS und organischen Lösungsmitteln (Methanol, Ethanol, DMF, DMSO) erwies sich schlussendlich 1 M Essigsäure als optimales, auch mit den PVC-Microtiterplatten verträgliches Medium für die Beschichtung dieser Platten mit den Peptiden.

Die Durchführung des Antikörper-Nachweises erfolgte nach dem in Tabelle 6 aufgeführten Schema.

Um die Empfindlichkeit der immunologischen Detektion zu optimieren, wurden, bei konstanten auf die Microtiterplatten aufgetragenen Peptidmengen (1.8 nMol in 50 µl 1 M Essigsäure), verschiedene Verdünnungen der Antiseren eingesetzt. Die Seren wurden dazu jeweils mit 1% fötalem Kälberserum (Gibco) in PBS verdünnt.

Neben der direkten Nachweismethode wurde auch ein kompetitiver Test ausgearbeitet. Die einzige Änderung im Vorgehen betraf die Behandlung der Antiseren. Anstatt diese direkt auf die mit Peptid beschichtete Microtiterplatte zu geben, wurden sie vorgängig mit definierten Mengen der Peptide in 1% FCS/PBS für 4 Stunden inkubiert. Die Abnahme der, via Protein A, gebundenen Radioaktivität kann dann als Mass für die nachweisbaren Mengen der Peptide verwendet werden.

- 1.) Beschichten ("Coaten") der PVC-Microtiterplatten (Falcon 3912) mit Antigen
(50 µl Peptidlösung : 100 mg/ml 1 M Essigsäure = 1.8 nMol/50 µl) für mindestens 4 Stunden
- 2.) 3-maliges Waschen der Vertiefungen mit "Phosphate Buffered Saline" (PBS pH 7.2)
- 3.) Absättigen der restlichen Bindungsstellen mit 1% fötalem Kälberserum (FCS) in PBS
- 4.) 3-maliges Waschen mit PBS
- 5.) Inkubation der beschichteten Microtiterplatten mit den Antiseren
- 6.) 3-maliges Waschen mit PBS
- 7.) Inkubation mit ^{125}I -Protein A (aus *Staphylococcus aureus*) (ca. 100'000 cpm/50 µl)
- 8.) 3-maliges Waschen mit PBS
- 9.) Bestimmung der gebundenen Radioaktivität im Gamma-Zähler (Kontron Gamma-matic)

Tabelle 6: Durchführung des Radioimmun-Tests.

Eine differenzierte Charakterisierung des immunologischen Verhaltens der beiden Peptidfraktionen (DBP-Aggregat und DBP-Monomer), sowie der chymotryptischen Fragmente derselben wurde von D. Holenstein im Rahmen ihrer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Desweiteren wurden im Verlaufe dieser Arbeit Methoden zur Isolation und Charakterisierung der spezifischen Anti-Peptid-Immunoglobuline G entwickelt (Holenstein, 1984). Detaillierte Angaben über die eingesetzten Materialien und Methoden können dieser Arbeit entnommen werden.

2.5 ANTIKOERPER GEGEN DDT

2.5.1 Synthese eines DDT-Derivats

- Kelthan (DDT-OH) = 2,2-Bis-(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethanol:	Riedel-de-Haën
- 3-Brompropionitril:	Fluka
- Natriumazid	Fluka
- Tetrabutylammoniumbromid	Fluka
- Triethylphosphit	Fluka
- HCl (gasförmig) wurde von Dr. C. Jenny, Org. Chem. Inst., zur Verfügung gestellt	
- Bernsteinsäureanhydrid	Fluka
- Pyridin (destilliert und über Molekularsieb aufbewahrt)	Fluka
- N,N-Dimethylformamid	Fluka
- Benzol (destilliert und über Natrium aufbewahrt)	Fluka

Tabelle 7: Verzeichnis der zur Synthese von 5,9-Diaza-11,11,11-trichloro-10,10-bis-(p-chlorophenyl)- 4,8-dioxo-undecansäure eingesetzten Chemikalien

Ausgehend vom DDT-Analogon Kelthan (DDT-OH) wurden Derivate, welche für die Kupplung an aktivierte Sepharosen (Affinitätschromatographie) oder an Proteine (Konjugat zur Immunisierung und für den Antikörper-Nachweis) geeignete funktionelle Gruppen aufweisen, synthetisiert. Mit der, über einen "Spacer" eingeführten, primären Aminogruppe steht ein weites Spektrum von Möglichkeiten zur Verankerung des DDT-Rests an polymeren Trägermaterialien zur Verfügung. Theoretisch eignet sich dieses Derivat auch zur Konjugation mit Proteinen. Dazu müssten jedoch, mangels geeigneter Aktivierungsmöglichkeiten für aliphatische, primäre Aminogruppen, die Carboxylgruppen des Trägerproteins aktiviert werden. Dabei ist naturgemäss mit einem hohen Anteil an unerwünschten Quervernetzungsreaktionen der Proteinmoleküle zu rechnen. Die daraus resultierende schlechte Löslichkeit der Konjugate würde den Nachweis spezifischer Antikörper massiv erschweren.

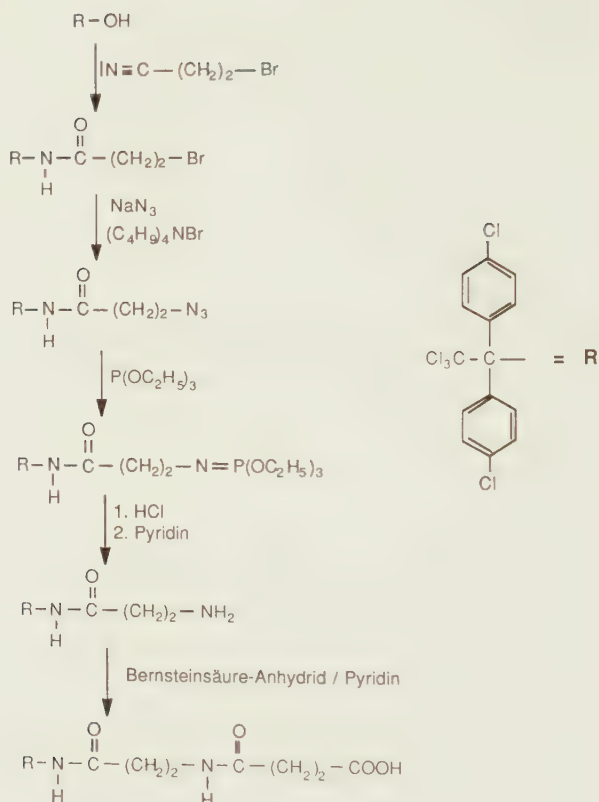


Abbildung 20: Synthese von 5,9-Diaza-11,11,11-trichloro-10,10-bis-(p-chlorophenyl)-4,8-dioxo-undecansäure

Um derartige Probleme zu umgehen, wurde in einem letzten Syntheseschritt, via N-Acylierung mit Bernsteinsäureanhydrid, eine Carboxylfunktion eingeführt.

Obige Abbildung soll einen Ueberblick über den gewählten Syntheseweg geben.

Mit der Substitution der tertiären Alkoholgruppe durch 3-Brompropionitril mit Hilfe der "Ritter-Reaktion", entsteht ein Alkylhalogenid ("N-DDT-3-Brompropionsäureamid"), welches, zumindest theoretisch

diverse Wege zur Einführung der gewünschten primären Aminogruppe offen lässt. "Gabriel-Synthese" (mit Kaliumphthalimid) und Substitution von Brom durch Cyanid scheiterten jedoch aufgrund der relativ hohen Basizität des Phthalimid-, respektive Cyanid-Ions. Anstelle der erwarteten Produkte wurde in beiden Ansätzen "N-DDT- β -Lactam" gebildet.

Da mit herkömmlichen analytischen Methoden (Massenspektrometrie (MS), Kernspinresonanz (NMR), Infrarotspektrometrie (IR)) eine eindeutige Identifikation des Produkts nicht möglich war, wurde die kristalline Substanz röntgenkristallographisch untersucht. Als Alternative zu den eingesetzten, relativ basischen Nucleophilen bot sich schliesslich die Substitution des Bromatoms durch Azid an. Um auch hier unter möglichst schonenden Bedingungen arbeiten zu können, wurde ein Phasen-Transfer-Katalysator (PTC) eingesetzt. Anstelle eines Flüssig-Flüssig-2-Phasen-Systems wurde Natriumazid direkt, d.h. ungelöst in organischem Lösungsmittel eingesetzt. Diese Modifikation (Fest-Flüssig-System) soll, gemäss Literatur (Koziara et al., 1985), noch zu einer Steigerung der Ausbeute, unter Beibehaltung der milden Bedingungen, führen. Zur Konversion des aus dieser Reaktion gewonnenen Alkylazids in das Amin stehen wiederum mehrere Möglichkeiten zur Auswahl. Die häufig eingesetzte katalytische Hydrierung brachte jedoch nicht den gewünschten Erfolg. Es wurde DDT als Endprodukt isoliert. Dieses, zuerst überraschende Resultat, wird bei näherer Betrachtung der Struktur des Edukts (siehe Abb. 20) verständlich, handelt es sich doch beim C-1-Atom des DDT-Rests um ein zweifach-benzylisches Kohlenstoffatom. Gruppierungen dieser Art werden zum Beispiel in der Peptidsynthese als Schutzgruppen, die durch katalytische Hydrierung abgespalten werden können, eingesetzt.

Als weitere Möglichkeit zur Überführung des Azids in das entsprechende primäre Amin, bietet sich die als Staudingerreaktion bekannte Umsetzung des Azids mit Triphenylphosphin und anschliessender Hydrolyse an. Da bei der Aufarbeitung und Reinigung des Produkts aus dieser Reaktion Probleme mit der Abtrennung des als Nebenprodukt gebildeten Triphenylphosphinoxids auftraten, wurde schlussendlich die Variante mit Triethylphosphit gewählt (Koziara et al., 1985). Das aus der Reaktion des Azids mit Triethylphosphit (Fluka) entstandene Iminophosphoran konnte durch Hydrolyse mit Chlorwasserstoff zum gewünschten Aminhydrochlorid gespalten werden.

Wie eingangs erwähnt, werden durch Einführung einer Carboxylgruppe wesentlich vorteilhaftere Bedingungen zur Kupplung des DDT-Derivats an ein Trägerprotein geschaffen. Zu diesem Zweck wurde das Aminhydrochlorid mit Pyridin in das freie Amin überführt und dieses anschliessend mit Bernsteinsäureanhydrid versetzt. Die durch die N-Acylierung erhaltene Substanz war das Endprodukt der gesamten Synthese (Abb. 21).

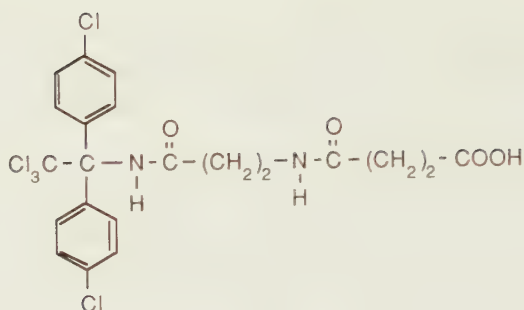


Abbildung 21: 5,9-Diaza-11,11,11-trichloro-10,10-bis-(p-chlorophenyl)-4,8-dioxo-undecansäure

Detaillierte Angaben zur Synthese des DDT-Derivats können der Arbeit von D. Bürgisser entnommen werden (Bürgisser, 1986).

2.5.2 Kupplung des DDT-Derivats an Rinderserumalbumin

- Rinder-Serumalbumin (Bovine Serum Albumin)	Sigma
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid x HCl (EDC)	Merck
- Dialyseschläuche Spectrapor 3	Spectrum Medical Industries
- Lösungsmittel siehe Tabelle7	

Tabelle 8: Chemikalien zur Synthese der DDT-BSA-Konjugate

Aus der Vielzahl der für die Herstellung von Hapten-Protein-Konjugaten geeigneten Trägerproteine, fiel die Wahl schliesslich auf Rinderserumalbumin (BSA). BSA weist gegenüber anderen Proteinen den Vorteil der relativ guten Löslichkeit, sowohl in wässrigen Lösungen, als auch in Gemischen derselben mit organischen Lösungsmitteln auf. Dies ist für eine erfolgreiche Kupplung der stark hydrophoben DDT-Derivate von einiger Bedeutung, erleichtert es doch die Durchführung der Kupplungsreaktion, die nachfolgende Charakterisierung des Konjugats und schlussendlich den

Nachweis der Antikörper. Die für die Kupplung des Haptens an das Protein erforderliche Aktivierung der Carboxylgruppe wurde mit Hilfe von Carbodiimiden und über die Bildung eines gemischten Anhydrids durchgeführt. Ein Vergleich der beiden Methoden zeigte, dass die Aktivierung der Carboxylgruppe mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid x HCl (EDC) günstiger ist, da die Verwendung von EDC, einem wasserlöslichen Carbodiimid, zu einer besseren Wasserlöslichkeit des DDT-Derivats, respektive des DDT-Derivat-EDC-Addukts führt, und damit auch besser kontrollierbare Kupplungsbedingungen geschaffen werden.

Durch Variation der molaren Verhältnisse (BSA : EDC : DDT-Derivat) konnten nahezu beliebige Epitopdichten erzeugt werden.

Die Aufarbeitung der Hapten-BSA-Konjugate umfasste Dialyse und anschließende Acetonfällung zur Abtrennung von polaren und apolaren Nebenprodukten und Verunreinigungen. Für den Nachweis der erfolgreichen Kupplung wurde jeweils ein Aliquot gelchromatographisch (Sephadex G-25 (Pharmacia), 1.5 x 25 cm, 0.1 M Na₂CO₃) gereinigt und anschliessend analysiert.

Beim Vergleich der Hydrolysate von nativem BSA und Konjugat, ergaben sich mit Ausnahme von Phenylalanin, identische Aminosäurezusammensetzungen. Diese Erhöhung des "Phenylalanin-Gehalts" in den Konjugaten konnte auf ein Hydrolyseprodukt aus dem gekuppelten DDT-Rest zurückgeführt werden. Ein Test sämtlicher Zwischenprodukte der DDT-Derivat-Synthese zeigte, dass es sich um das Produkt des für die Konstruktion des "Spacers" eingesetzten 3-Brompropionitrils, also 3-Aminopropionsäure (β -Alanin) handelt. Die Analyse einer Referenzlösung von β -Alanin bestätigte dieses Ergebnis. Offenbar weisen Phenylalanin und β -Alanin in den zur Aminosäureanalyse eingesetzten Puffersystemen identische Retentionszeiten auf. Mit der Bestimmung des Farbfaktors von β -Alanin stand somit eine einfache, quantitative Methode für den Nachweis der erfolgten Kupplung des DDT-Derivats und zur Berechnung der erzielten Epitopdichten zur Verfügung.

Wie schon die Synthese des DDT-Derivats, wurden auch die Arbeiten zur Konjugation dieser Verbindung mit BSA in Zusammenarbeit mit D. Bürgisser ausgeführt. Detaillierte Angaben zum experimentellen Vorgehen finden sich in der entsprechenden Arbeit (Bürgisser, 1986).

2.5.3 Immunisierung und Charakterisierung der Antikörper

Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem DDT-BSA-Konjugat (25 DDT-Reste/BSA) wurde ebenfalls nach dem für die Erzeugung von Anti-DBP-Antikörpern beschriebenen Verfahren (Kap. 2.4) durchgeführt. Die erste Injektion des Konjugats (100 μ g) wurde wiederum als Emulsion aus komplettem Freund'schem Adjuvans und PBS verabreicht. Für alle folgenden, monatlichen Injektionen ("Booster") wurde inkomplettes Freund'sches Adjuvans verwendet. Zur Gewinnung der

Testseren wurden die abgenommenen Blutproben wiederum über Nacht bei 4°C aufbewahrt und anschliessend zentrifugiert. Der Ueberstand wurde abpipettiert, portioniert und tiefgefroren. Der Nachweis von Antikörpern erfolgte mittels Radioimmuntest-Techniken. Neben dem als Antigen eingesetzten DDT-BSA-Konjugat wurden für den Nachweis der Immunglobuline auch die entsprechenden Konjugate des DDT-Derivats mit Schaf- und Kaninchenserumalbumin eingesetzt. Der Nachweis der DDT-spezifischen Antikörper erfolgte im kompetitiven RIA nach dem für den Nachweis der Anti-Peptid-Antikörper geschilderten Vorgehen (Tab. 6). Zur Bestimmung der Spezifität wurden die zu testenden Antiseren, neben DDT, auch mit DDA, p-Chlorophenol und p-Chlorobenzoesäure inkubiert. Die Zugabe dieser Substanzen erfolgte jeweils als Lösung in 1% FCS/PBS. Diese wurden durch Zugabe kleiner Volumina ethanolischer Stammlösungen der Chemikalien zur FCS-Lösung hergestellt. Die Inkubation mit den verdünnten Antiseren erfolgte jeweils für mindestens 6 Stunden. Anschliessend wurden diese Gemische auf die mit dem DDT-BSA-Konjugat beschichteten Microtiterplatten aufgetragen und nach dem üblichen, bereits geschilderten Prozedere weiterbehandelt.

RESULTATE UND DISKUSSION

3.1 SYNTHESE VON THR¹⁵, THR¹⁷-DBP UND TRP¹⁶-DBP

Die Synthese des gemeinsamen Vorläufers (Phe24 - Pro18) der beiden Analoga verlief, den Erwartungen entsprechend problemlos. Einzig die Veresterung des C-terminalen Aminosäure-Derivats Boc-Phenylalanin, respektive dessen Cäsiumsalz, mit dem chloromethylierten Polystyrolharz zeigte nicht die erwartete Kupplungsausbeute. Unter den gewählten Bedingungen (molare Verhältnisse, Reaktionszeit) wäre, gemäss Literaturangaben (Gisin, 1973) eine Substitution in der Grössenordnung von 0.2 bis 0.25 mMol pro Gramm Harz zu erwarten gewesen. Der nach Harzhydrolyse und Aminosäureanalyse (im Duplikat) bestimmte Wert von 0.105 mMol/g entspricht somit einer praktischen Kupplungsausbeute von 50 %. Die Ursachen für dieses unerwartete Resultat sind unklar und bedürften relativ aufwendiger Abklärungen. Mit Ausnahme einer entsprechend verminderten PeptidAusbeute, die jedoch durch Verwendung einer proportional grösseren Menge Aminosäure-Harz kompensiert wurde, war aber keine nennenswerte Beeinflussung der Qualität der Endprodukte zu erwarten. So ist zum Beispiel die Konzentration der noch verbleibenden, nicht derivatisierten Chloromethylgruppen auf dem Polystyrolharz, gegenüber der normal verlaufenden Veresterung, lediglich um ca. 10% erhöht, d.h. die Wahrscheinlichkeit von störenden Nebenreaktionen der im Verlaufe der Synthese eingesetzten Reagenzien mit diesen Chloromethylgruppen (Quaternisierungsreaktionen im Neutralisationsschritt mit Triethylamin) ist ebenfalls nur unwesentlich erhöht. Andere störende Nebeneffekte waren nicht zu erwarten, weshalb auf die Ansetzung einer neuen Harzkupplung verzichtet und die Synthese mit diesem Material gestartet wurde.

Die Aminosäureanalyse nach Hydrolyse des Heptapeptid-Harzes zeigte den korrekten Ablauf der ersten 6 Synthesezyklen. Die Aminosäuren lagen, mit Ausnahme von Isoleucin, in den erwarteten molaren Verhältnissen vor. Die zu niedrigen Werte für Isoleucin sind jedoch auf die Anordnung dieser Aminosäurereste innerhalb der Sequenz zurückzuführen. Es ist allgemein bekannt, dass derartige Teilsequenzen (mehrere aliphatische Aminosäuren in Serie) erst unter drastischeren Bedingungen, oder nach längeren Reaktionszeiten vollständig hydrolysiert werden. Durch entsprechende Versuche (48 und 72 Stunden Hydrolyse) konnte dies bestätigt werden.

Die restlichen 17 Synthesezyklen für jedes der beiden Analoga konnten ebenfalls problemlos durchgeführt werden. Peptidharzproben, die zur Kontrolle der korrekt verlaufenden Synthesen, jeweils nach der Kupplung von Alanin entnommen, gewaschen, hydrolysiert und analysiert worden waren, zeigten wiederum die erwarteten Zusammensetzungen.

Bei der, nach der HF-Spaltung durchgeführten Extraktion der Peptide aus dem Harz, zeigten sich beim Trp¹⁶-Analogon Schwierigkeiten mit der Löslichkeit des Peptids in wässrigen Lösungsmitteln (1 M

Essigsäure). Erst mit der Verwendung von 50% Essigsäure (v/v, in Wasser) konnte das ölige Rohprodukt vollständig aus dem Polystyrolharz isoliert werden.

Die auf die N->O-Acylshift-Reversierung folgende Dialyse verlief, trotz Verwendung grossporiger Dialyseschläuche, ohne Schwierigkeiten, da schon zu Beginn die Präzipitation der Peptide in den Schläuchen einsetzte. Durch Ninhydrintest konnte gezeigt werden, dass kein Peptid aus den Schläuchen austrat. Die nachfolgende Lyophilisation ergab in beiden Fällen ein flockiges, relativ voluminöses Peptidrohprodukt.

3.2 REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER PEPTIDE

Vor dem ersten eigentlichen Reinigungsschritt wurde von allen 4 Peptidrohprodukten (DBP; Thr¹⁵, Thr¹⁷-DBP; Trp¹⁶-DBP; Val¹⁴-DBP) eine Aminosäureanalyse durchgeführt (Ergebnisse nicht aufgeführt).

Es muss jedoch betont werden, dass die Resultate nur als Anhaltspunkte für das Gelingen der einzelnen Synthesen betrachtet werden können. Unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen der Aminosäureanalyse und vor allem der statistischen Verteilung allfällig auftretender Fehlsequenzen (Kettenabbrüche, Einzeldelationen etc) ist die gute Übereinstimmung zwischen theoretischer und gemessener Zusammensetzung nicht überraschend. Analysen von gereinigten Peptidfraktionen besitzen deshalb, in Verbindung mit anderen Reinheitskriterien, wesentlich grössere Aussagekraft.

3.2.1 Gelchromatographie

In Abbildung 23 sind die Elutionsprofile der Chromatographie der 4 Peptide (Rohprodukte) auf Sephadex G-50 in 1M Essigsäure dargestellt.

Bei allen 4 Profilen fällt auf, dass neben den zu erwartenden Fraktionen M (monomer) und V (kleinmolekulare Substanzen) noch eine zusätzliche, offenbar relativ hochmolekulare Peptid-Aggregat-Fraktion A (Aggregat) auftritt. Aggregate im mittleren Massenbereich (Trennbereich von Sephadex G-50: 1.5 bis 30 kD) scheinen jedoch kaum vorhanden zu sein. Moser et al. (Moser et al., 1983) konnten für das DBP zeigen, dass diese Aggregation durch Zugabe organischer Lösungsmittel, respektive bei Chromatographie in wässrig-ethanolischer Lösung, vollständig aufgehoben werden kann.

Dieses Resultat konnte bei der Chromatographie der 3 Analoga in 50% Ethanol/Wasser (v/v) (Bestimmung der DDT-Peptiddissoziationskonstanten) bestätigt werden.

Das Aggregationsverhalten der Peptide in wässrigen Lösungen dürfte auf die speziellen chemisch-physikalischen und strukturellen Eigenschaften (grosse Hydrophobizität, β -Faltblatt-Struktur) zurückzuführen sein. Die Aggregation der Peptidmoleküle über hydrophobe Interaktionen (Van-der-Waals- Wechselwirkungen) führt zu einer Verkleinerung der relativen Oberfläche und gibt damit den einzelnen Molekülen die Möglichkeit, Kontakte zum wässrigen, polaren Milieu zu minimalisieren. Dieser Befund wird durch die beobachtete Aufhebung der intermolekularen Wechselwirkungen bei Zugabe von Ethanol (oder anderen organischen Lösungsmitteln, welche bekanntermassen zu einer Schwächung oder Aufhebung derartiger Interaktionen führen) zusätzlich gestützt. Unklar bleibt lediglich, weshalb bei allen vier untersuchten Peptiden hauptsächlich hochaggregiertes und monomeres Material, aber nahezu keine Zwischenfraktionen, auftreten.

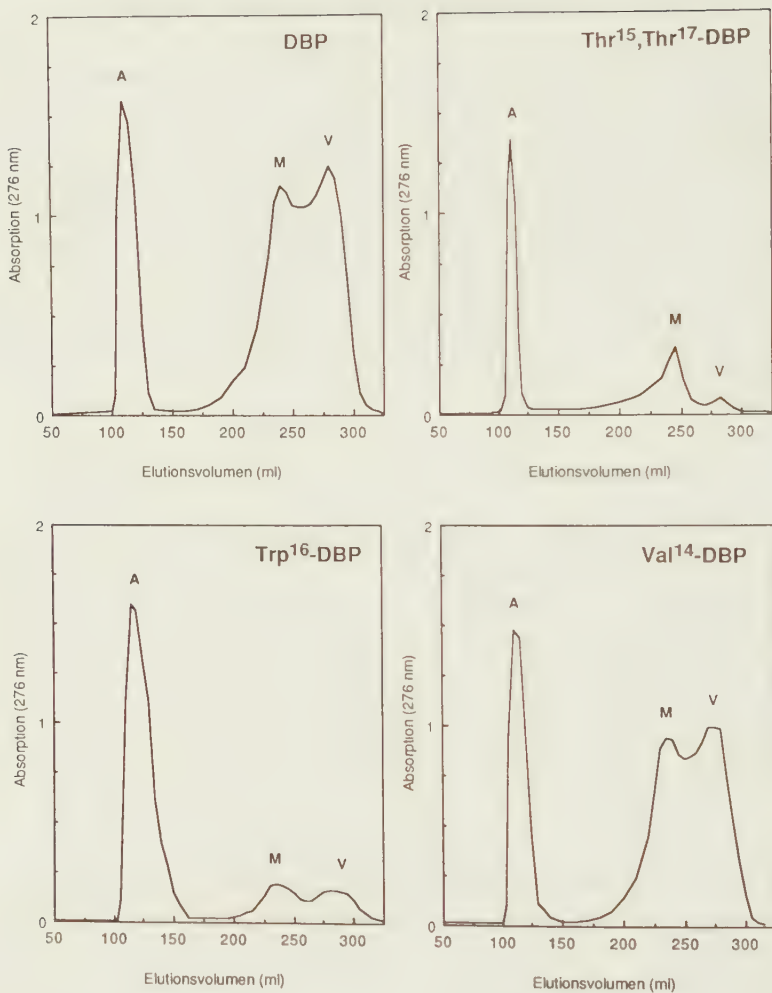


Abbildung 23. Chromatographie der 4 Peptide auf Sephadex G-50 in 1 M Essigsäure
 A = Aggregat-Fraktion; M = Monomer-Fraktion;
 V = kleinmolekulare Verunreinigungen

Die apparente, von Moser (Moser, 1986) mittels Gelchromatographie und analytischer Ultrazentrifugation bestimmte Molmasse des DBP-Aggregats liegt in der Grössenordnung von 500 bis 1500 Kilodalton. Für die beiden Analoga Thr¹⁵,Thr¹⁷-DBP und Trp¹⁶-DBP wurden bei der Chromatographie auf Sephacryl S-300 (Trennbereich 10-1500 kD) mit Dextranblau (ca. 2000 kD), Rinderserumalbumin (67 kD) und Carboanhydrase (29 kD) als Referenzen ähnliche Aggregatmassen bestimmt. Mit diesen Messungen konnte die Vermutung, dass die beiden Tyrosinseitenketten (Tyr 15, Tyr 17) einen massgeblichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten ausüben, eindeutig widerlegt werden. Andernfalls wäre bei der Chromatographie des Threonin-Analogons (Tyr15->Thr, Tyr17->Thr) lediglich die monomere Fraktion zu erwarten gewesen. Dies und die chromatographischen Eigenschaften der anderen Peptide deuten darauf hin, dass die zur Aggregation führenden Wechselwirkungen zwischen den Peptidmolekülen von relativ unspezifischer Natur sein müssen.

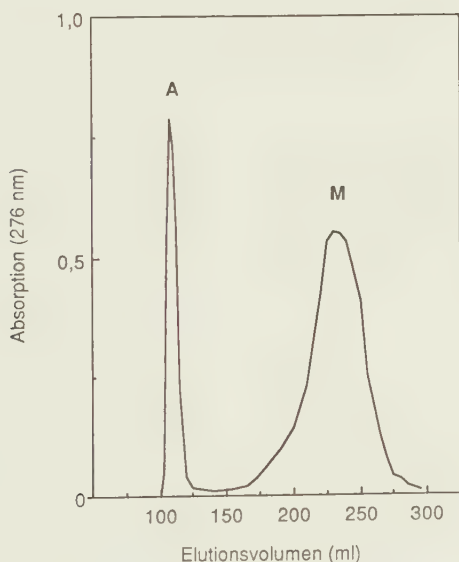


Abbildung 24: Nachweis des DBP-Aggregat-Monomer-Gleichgewichts durch Gelchromatographie (Sephadex G-50, 1M Essigsäure). Aufgetragen wurden 30 mg Monomer-Material (nach 6-12 stündiger Vorinkubation in 1M Essigsäure).
Ausbeuten: Aggregat (A): 7.6 mg Monomer (M): 18.5 mg

Die Experimente, in denen die monomeren Fraktionen (M) der Peptide, nach Inkubation in 1M Essigsäure, rechromatographiert wurden, bestätigten die Annahme, dass es sich beim beobachteten Aggregationsverhalten um ein Gleichgewicht zwischen den monomeren und polymeren Formen handeln muss (Abb. 24).

Auch die mehrfache Rechromatographie der Monomer-Fraktion ergab immer das gezeigte Elutionsprofil.

Die mittels Aminosäureanalysen bestimmten Zusammensetzungen der Aggregatfraktionen nach G-50-Chromatographie sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die erhaltenen Werte stimmen mit der theoretischen Zusammensetzung, unter Berücksichtigung der Reinheit der Produkte (siehe RP-HPLC-Chromatogramme, Abb. 25) und der experimentellen Fehlergrenzen, relativ gut überein.

	DBP		Thr ¹⁵ , Thr ¹⁷ -DBP		Trp ¹⁶ -DBP		Val ¹⁴ -DBP	
Asp	3.12	(3)	3.50	(3)	3.42	(3)	3.61	(3)
Thr	1.95	(2)	4.27	(4)	2.02	(2)	2.00	(2)
Ser	0.95	(1)	0.88	(1)	1.04	(1)	0.89	(1)
Pro	1.92	(2)	2.06	(2)	1.98	(2)	1.88	(2)
Gly	1.25	(1)	0.98	(1)	1.18	(1)	1.13	(1)
Ala	1.16	(1)	0.91	(1)	1.14	(1)	1.05	(1)
Val	1.14	(1)	0.71	(1)	0.78	(1)	1.96	(2)
Met	2.05	(2)	1.41	(2)	1.69	(2)	1.50	(2)
Ile	3.20	(4)	4.28	(4)	3.88	(4)	4.07	(4)
Tyr	1.82	(2)	-	(-)	1.97	(2)	1.99	(2)
Phe	3.17	(3)	3.42	(3)	3.34	(3)	2.23	(2)
His	1.01	(1)	0.98	(1)	-	(-)	0.61	(1)
Arg	1.18	(1)	0.60	(1)	0.92	(1)	0.77	(1)
Trp	-	(-)	-	(-)	0.88	(1)	-	(-)

Tabelle 8: Aminosäurezusammensetzungen der 4 Peptide (hochmolekulare G-50-Fractionen), nach Hydrolyse in Salzsäure/Thioglykolsäure (93/7, v/v). Theoretisch zu erwartende Werte sind in Klammern angegeben.

Erwartungsgemäss zeigen die Analysen der RP-HPLC-isolierten Fraktionen (siehe Abb. 26) noch wesentlich bessere Ergebnisse (Tabelle 9) und bestätigen damit die Homogenität dieser Fraktionen. Ein Vergleich der verschiedenen angewendeten Hydrolyse-Methoden zeigte, dass in Gegenwart von Thioglykolsäure bessere Resultate zu erwarten sind. Dies dürfte wiederum mit dem besonderen, hydrophoben Charakter der Peptide in Zusammenhang stehen.

Tsugita und Scheffler (Tsugita & Scheffler, 1982) zeigten, dass die Hydrolyse hydrophober Peptide und Proteine in Gegenwart von Trifluoressigsäure und Phenol gegenüber der konventionellen Hydrolyse (nur HCl) bessere Analyseresultate liefert. Neben ihrer Wirkung als Oxidationsschutz (vor allem für Tryptophan-, aber auch andere Aminosäure-Reste) scheint die eingesetzte Thioglykolsäure einen zu TFA/Phenol-Gemischen vergleichbaren Effekt auf die Hydrolyse hydrophober Peptide auszuüben.

3.2.2 "Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography" (RP-HPLC)

Mit den heute zur Verfügung stehenden Möglichkeiten (Geräte, Säulen etc.) ist diese Methode eines der wichtigsten und universellsten analytischen Instrumente für den Peptid-Chemiker (-Synthetiker). Mit den hohen Trennleistungen und Chromatographieausbeuten kann für nahezu jedes analytische Problem eine optimale Lösung erarbeitet werden. Schwierigkeiten sind allenfalls, wie eigene Untersuchungen zeigten, beim Uebergang von der analytischen zur präparativen Anwendung zu gewärtigen.

Abbildung 25 zeigt die Elutionsprofile der 4, nach G-50-Chromatographie erhaltenen, hochmolekularen Fraktionen (DBP und Analoga) auf RP-HPLC.

Auffallend ist das bei allen 4 Peptidfraktionen auftretende "Peak"-Muster. Neben einer Hauptkomponente (mit korrekter Aminosäurezusammensetzung) und einer mehr oder weniger signifikanten Nebekomponente sind nur noch in geringeren Mengen vorhandene Verunreinigungen feststellbar. Die Versuche mit anderen Lösungsmittelsystemen brachten hinsichtlich Trennung und Chromatographieausbeute keine nennenswerten Verbesserungen. Hingegen brachte der Einsatz der Nucleosil-Säule mit 5 µm-Säulenmaterial, welche jedoch erst kurz vor Abschluss der Arbeiten verfügbar war, eine, gegenüber der vorher verwendeten Säule (Aquapore RP-300, 10 µm Säulenmaterial) erhöhte Trennleistung, dies allerdings, wie Experimente für den semipräparativen Einsatz ergaben, nur im analytischen Bereich. Die Nucleosil-Säule (5 µm-Säulenmaterial) reagierte schon bei geringfügiger Ueberladung mit einem drastischen Zusammenbruch der Trennleistung, konnte aber durch Spülen mit dem jeweiligen Lösungsmittel B wieder vollständig regeneriert werden.

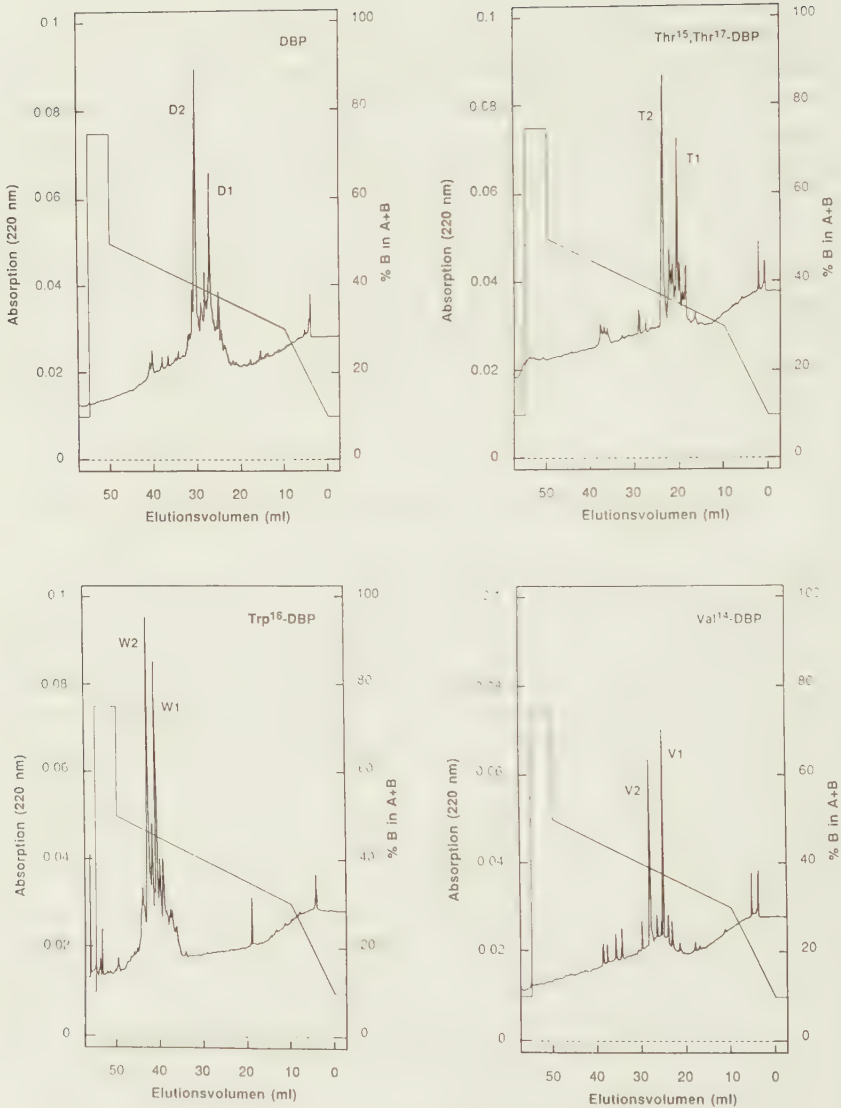


Abbildung 25.

RP-HPLC-Chromatogramme der 4 Aggregat-Fractionen nach G-50 Chromatographie

Lösungsmittelsystem: A: 0.1% TFA; B: 100% Acetonitril; Säule: NS-300 5C8

Aufgetragene Mengen:

DBP (100 µg); Thr¹⁵,Thr¹⁷-DBP (150 µg); Trp¹⁶-DBP (50 µg); Val¹⁴-DBP (100 µg)

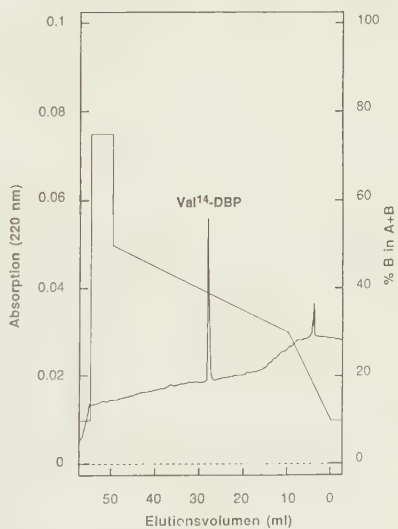
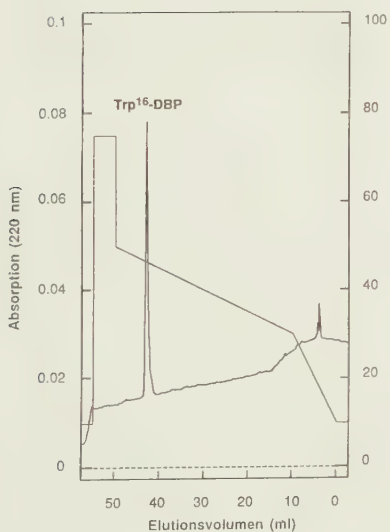
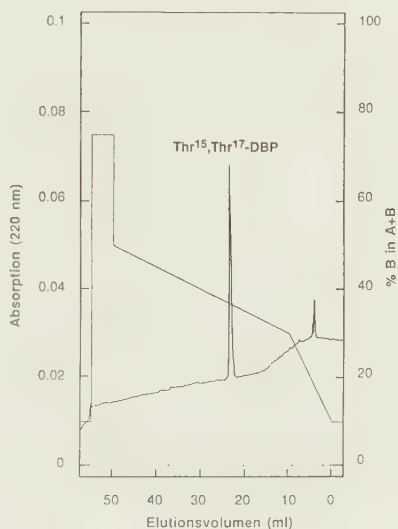
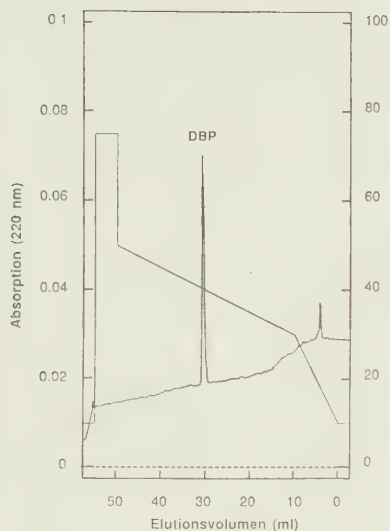


Abbildung 26: Rechromatographie der RP-HPLC-Hauptfraktionen (aus Abb. 25)

Lösungsmittelsystem: A: 0.1% TFA; B: 100% Acetonitril; **Säule:** NS-300 5C8

Aus diesen Gründen mussten alle Isolationen grösserer Peptidmengen, sei dies für Sequenzierungsarbeiten, N-Terminus-Bestimmungen oder immunologische Experimente etc., durch mehrfache Chromatographie auf der Aquapore RP 300-Säule (10 µm-Säulenmaterial) durchgeführt werden.

Die Rechromatographie (Abb. 26) der gesammelten Haupt-"peaks" ergab für alle Peptide eine homogene Fraktion mit korrekter Aminosäurezusammensetzung (Tabelle 9). Beim DBP konnte die Homogenität der Hauptfraktion durch Sequenzierung zusätzlich nachgewiesen werden.

Anhand der Retentionszeiten der 4 Peptidfraktionen kann eine Abschätzung der Gesamthydrophobizität der jeweiligen Peptide vorgenommen werden. Erwartungsgemäss ergibt sich dabei folgende, nach zunehmender Hydrophobizität geordnete Reihe: Thr¹⁵,Thr¹⁷-DBP; Val¹⁴-DBP; DBP; Trp¹⁶-DBP.

Die Chromatographie auf der semipräparativen Säule brachte nicht den gewünschten Erfolg, da die Auflösung der relativ nahe beieinander eluierenden Peptidfraktionen (vergleiche Abb. 25) zu gering und somit ein sinnvoller Einsatz dieser Säule für die Isolation grösserer, homogener Peptidfraktionen nicht möglich war.

	DBP		Thr ¹⁵ ,Thr ¹⁷ -DBP		Trp ¹⁶ -DBP		Val ¹⁴ -DBP	
Asp	2.89	(3)	2.84	(3)	3.11	(3)	3.15	(3)
Thr	1.85	(2)	3.72	(4)	1.90	(2)	1.89	(2)
Ser	0.81	(1)	0.88	(1)	0.86	(1)	0.89	(1)
Pro	2.08	(2)	2.12	(2)	1.98	(2)	1.93	(2)
Gly	1.06	(1)	1.07	(1)	1.09	(1)	1.11	(1)
Ala	0.98	(1)	0.92	(1)	0.95	(1)	1.04	(1)
Val	1.05	(1)	0.90	(1)	0.92	(1)	1.93	(2)
Met	1.89	(2)	1.78	(2)	1.84	(2)	1.79	(2)
Ile	3.87	(4)	3.68	(4)	3.77	(4)	3.80	(4)
Tyr	1.86	(2)	-	(-)	1.86	(2)	1.82	(2)
Phe	2.80	(3)	3.18	(3)	2.93	(3)	1.89	(2)
His	1.01	(1)	0.98	(1)	-	(-)	0.85	(1)
Arg	0.92	(1)	0.88	(1)	0.92	(1)	0.94	(1)
Trp	-	(-)	-	(-)	0.88	(1)	-	(-)

Tabelle 9. Aminosäurezusammensetzungen der rechromatographierten Haupt-"Peaks" (HPLC)
(Hydrolyse: 48 Stunden in Salzsäure/Thioglykolsäure (93/7,v/v))

3.2.3 Bestimmung der N-Termini

Die Bestimmung des N-Terminus an den RP-HPLC-isolierten Haupt- und Nebenfraktionen ergab für alle 4 Peptide (8 Proben) einheitliche Resultate. Neben Dansyl-Methionin konnten lediglich experimentell bedingte Nebenprodukte (z.B. Dansylhydroxid) gefunden werden.

3.2.4 Exopeptidase-Verdauungen

Die Verdauung der beiden HPLC-Fraktionen des DBP (D1,D2 in Abb. 25) mit Aminopeptidase M, respektive Carboxypeptidase Y ergab in beiden Fällen die aus der Sequenz des Peptids abzuleitenden Resultate. Die Verdauung des N-Terminus ermöglichte die eindeutige Identifikation der ersten 4 Aminosäuren (Met, Thr,Phe,Ile); am C-Terminus konnte, wiederum bei beiden Fraktionen die korrekte Sequenz der 6 terminalen Aminosäuren (Phe 24 bis Asn 19) nachgewiesen werden. Damit waren, aus den Aminosäureanalysen abgeleitete Vermutungen, dass Fraktion D1 eine N- oder C-terminale Deletion (Methionin und/oder Isoleucin) aufweist, entkräftet. In der Hoffnung, die zu einer Trennung auf RP-HPLC führenden Differenzen zwischen den beiden DBP-Fraktionen eruieren zu können, wurde die vollständige Sequenzanalyse durch Edman-Abbau in Angriff genommen.

3.2.5 Sequenzierung

Die N-terminale Aminosäure (PTH-Derivat) der DBP-RP-HPLC-Fraktionen D1 und D2 (vergleiche Abb. 25) wurde, nach der vorgängigen Modifikation der N-Termini mit Phenylisothiocyanat jeweils nicht nachgewiesen, da sie zuvor schon durch Dansylierung und Aminopeptidase-Verdauung eindeutig identifiziert worden war. Alle weiteren, in der Sequenz folgenden Aminosäuren wurden, als entsprechende Thiohydantoin-Derivate, sowohl dünnsschicht-, als auch säulenchromatographisch nachgewiesen. Bei der als 2. Peak von RP-HPLC eluierenden Fraktion D2 konnte die erwartete Sequenz vollumfänglich bestätigt werden. Im Rahmen der experimentellen Fehlergrenzen konnte auch die Homogenität dieser Fraktion gezeigt werden.

Problematischer wird die Interpretation der Resultate aus der Sequenzierung der als erster Peak eluierenden Fraktion D1. Aufgrund der beobachteten Heterogenitäten ist eine eindeutige Sequenzzuordnung nicht möglich.

Eine Zusammenfassung der angewendeten Reinigungs- und Charakterisierungsmethoden zeigt, dass aus den synthetisierten Peptiden durch einen Reinigungsschritt (Gelchromatographie auf

Sephadex G-50), Material, das in seiner Aminosäurezusammensetzung homogen ist, gewonnen werden kann. Für spezielle Anwendungen kann dieses Peptidmaterial mittels RP-HPLC, in einem zweiten Reinigungsschritt zu einer einzigen, nach diversen Analysemethoden homogenen Fraktion, aufgearbeitet werden. Für die meisten Experimente wurde jedoch auf diese Aufarbeitung verzichtet und die jeweiligen G-50 Fraktionen (Aggregat) verwendet.

3.2.6 Bestimmung der Peptid-DDT-Dissoziationskonstanten

Tabelle 10 gibt einen Ueberblick über die nach der Methode von Hummel und Dreyer (Hummel & Dreyer, 1962) ermittelten Dissoziationskonstanten der Komplexe der 4 Peptide mit DDT.

Peptid	Ligand	apparente Dissoziationskonstante (K_D)
DBP	DDT	$0.8 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($\pm 3 \times 10^{-7} \text{ M}$)
Thr ¹⁵ , Thr ¹⁷ -DBP	DDT	$2.8 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($\pm 7 \times 10^{-7} \text{ M}$)
Trp ¹⁶ -DBP	DDT	$0.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($\pm 7 \times 10^{-7} \text{ M}$)
Val ¹⁴ -DBP	DDT	$1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($\pm 1 \times 10^{-6} \text{ M}$)

Tabelle 10: Nach der Methode von Hummel & Dreyer bestimmte Dissoziationskonstanten der Komplexe zwischen den 4 Peptiden und DDT. Die ermittelten Werte sind Durchschnitte aus jeweils 3 Messungen.

Da aufgrund der Löslichkeit von DDT und den Peptiden ethanolische Lösungen als Laufmittel für die Chromatographie verwendet wurden, handelt es sich bei den gemessenen Werten lediglich um apparente Dissoziationskonstanten. Damit muss auch der Umstand, dass sowohl die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Peptid, als auch die strukturbestimmenden hydrophoben Interaktionen im Peptidmolekül geschwächt oder sogar aufgehoben werden können, berücksichtigt werden.

Wie die aus den 3 Bestimmungen ermittelten Standardabweichungen zeigen, traten vor allem bei den Analoga Thr¹⁵, Thr¹⁷- und Trp¹⁶-DBP Schwierigkeiten auf. Diese sind für das Threonin-Analogon auf

die geringe Absorption des Peptids bei 276 nm und die daraus resultierenden hohen Fehlergrenzen bei der Berechnung der Dissoziationskonstanten zurückzuführen. Beim Trp¹⁶-Analogon führte die geringe Löslichkeit des Peptids zu ähnlichen Problemen mit der Auswertung der spektroskopischen Daten.

Die vollständige Einstellung der Gleichgewichte zwischen den Peptiden und DDT konnte durch Chromatographie unter identischen Bedingungen, auf einer kürzeren Säule (0.9 x 33 cm) gezeigt werden.

Ein Vergleich der gemessenen Dissoziationskonstanten der 4 Peptide zeigt, dass die Erwartungen (siehe Kap. 1.1.1) erfüllt oder sogar übertroffen wurden. DBP, Thr¹⁵,Thr¹⁷-DBP und Trp¹⁶-DBP zeigen, unter Berücksichtigung der experimentellen Fehlergrenzen, identische K_D -Werte. Die um einen Faktor 10-20 schlechtere DDT-Bindung des Val¹⁴-Analogons (Linden, 1986) konnte bestätigt werden. Die gegenüber den Messungen von Moser (Moser, 1986) für das DBP und Linden (Linden, 1986) für das Val¹⁴-DBP um circa eine Zehnerpotenz verbesserten Konstanten dürften auf die Verwendung eines Lösungsmittelsystems mit kleinerem Ethanolgehalt (50% anstelle von 55%) einerseits und auf die unterschiedlichen, eingesetzten Gelmaterialien (Sephadex LH-20 anstelle von Sephadex LH-60) andererseits, zurückzuführen sein.

Insgesamt stimmen die Ergebnisse sehr gut mit den aus dem Modellbau gezogenen Schlüssen überein (Kap. 1.1.1).

3.2.7 UV-Absorptionsspektren und Circular dichroismus

Abbildung 27 zeigt die UV-Absorptionsspektren der Peptide (DBP; Thr¹⁵,Thr¹⁷-DBP; Trp¹⁶-DBP; Val¹⁴-DBP).

DBP und Val¹⁴-DBP zeigen ein typisches, durch die beiden Tyrosin-Reste hervorgerufenes Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 276 nm. Weitere Maxima bei tieferen Wellenlängen sind ebenfalls auf das Absorptionsverhalten der aromatischen Seitenketten (Tyr, Phe) zurückzuführen. Entsprechend der Substitution der beiden Tyrosin-Reste durch Threonin entfällt im Thr¹⁵,Thr¹⁷-Analogon das Maximum bei 276 nm. Die im Bereich von 250-270 nm auftretenden Maxima werden durch die 3 Phenylalanin-Reste verursacht.

Ebenfalls typisch ist das Spektrum des Trp¹⁶-Analogons, dessen von 276 nach 278 nm verschobenes Absorptionsmaximum das Vorhandensein des Tryptophan-Rests anzeigt.

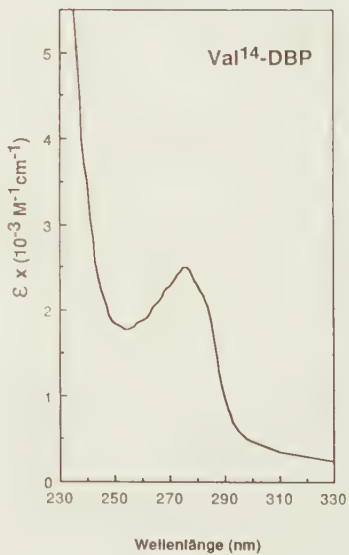
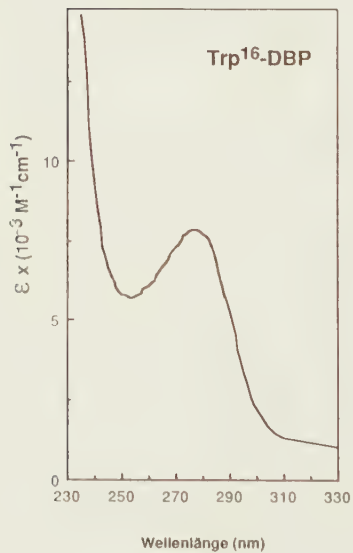
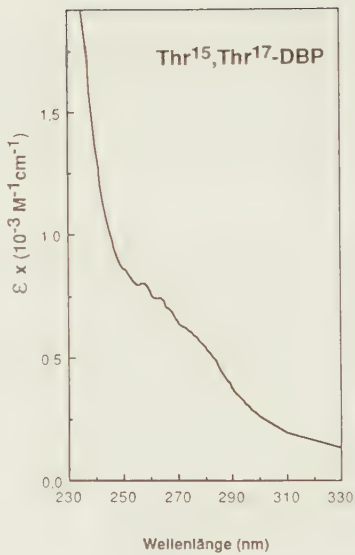


Abbildung 27: UV-Absorptionsspektren der Peptide in Ethanol/50mM NH_4HCO_3 (1/1, v/v).

Zum Vergleich ist in Abbildung 28 das Spektrum von DDT aufgeführt.



Abbildung 28: UV-Absorptionsspektrum von DDT in Ethanol/50 mM NH_4HCO_3 (1/1, v/v).

In Abbildung 29 sind die UV-CD-Spektren für den Wellenlängenbereich 200 - 250 nm abgebildet.

Die starken Banden im Wellenlängenbereich von 200-205 nm stammen eindeutig von ungeordneten Strukturen in den Peptiden. Im längerwelligen Bereich sind jedoch einige Banden, welche von geordneten Strukturen verursacht werden könnten, auszumachen (210-215 nm und 220-225 nm). Wegen des grossen Anteils aromatischer Aminosäuren in den Peptiden (20-25%), muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass die Banden im Bereich von 220-230 nm nicht von Sekundärstrukturen, sondern von diesen aromatischen Aminosäure-Seitenketten verursacht werden können.

Eine Berechnung der Sekundärstrukturanteile nach der Methode von Provencher und Glöckner (Provencher & Glöckner, 1981; Provencher, 1982; Schnarr & Maurizot, 1982) für das DBP, wurde von Moser durchgeführt (Moser, 1986). Die erhaltenen Werte (11% α -Helix, 37% β -Faltblatt und 52% Reststrukturen) stimmen zwar sehr gut mit den Erwartungen überein, sind aber trotzdem mit einiger

Vorsicht zu bewerten. Dies hauptsächlich deshalb, weil die verwendeten Programme auf einer statistischen Analyse zahlreicher Proteine beruhen und damit für eine spezifische Analyse von Peptid-CD-Spektren an und für sich ungeeignet sind. Hinzu kommt, dass die Zuverlässigkeit der Strukturermittlung aus CD-Spektren in der Reihenfolge α -Helix, β -Faltblatt, β -Turn und ungeordnete Reststrukturen abnimmt (Schnarr & Maurizot, 1982)

Aus diesem Grunde und wegen der Komplexität der 4 UV-CD-Spektren der Peptide wurde auf eine weitere, detaillierte Auswertung verzichtet.

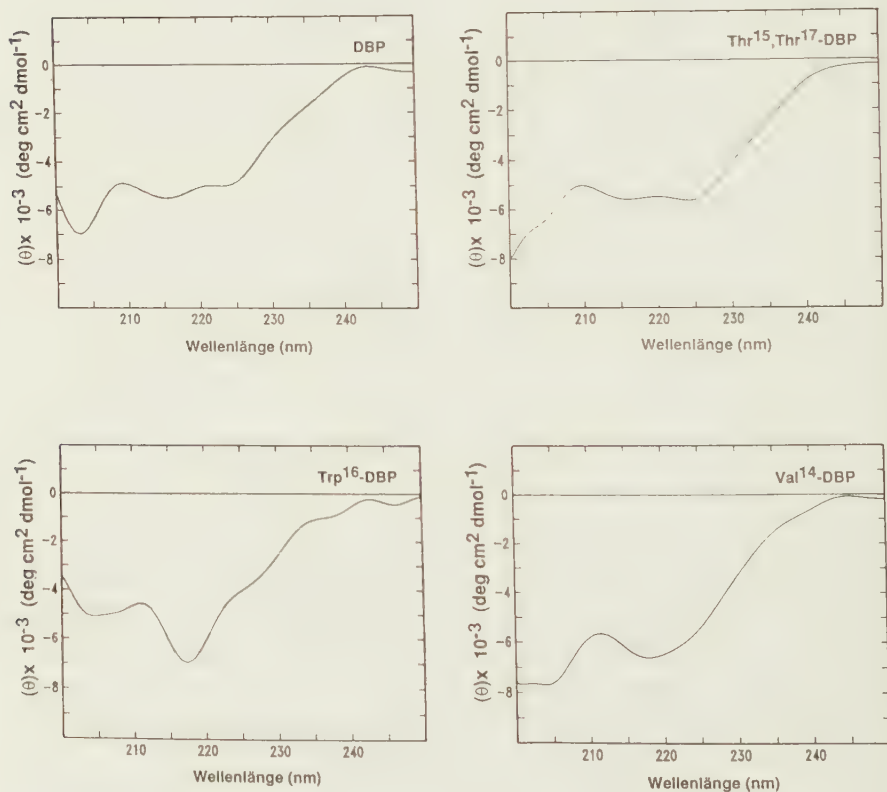


Abbildung 29: UV-CD-Spektren des DBP und der 3 Analoga in Ethanol/50 mM NH_4HCO_3 (1/1, v/v)

3.3 SYNTHESE-AUTOMAT

Der Aufbau des Synthese-Automaten ging problemlos vor sich. Schon in ersten Testläufen mit der ursprünglichen Version ergaben sich jedoch Schwierigkeiten mit der Dosierung der gewünschten Lösungsmittelvolumina (Abmessung durch konstanten Spritzenhub). Nach Modifikation dieser Einheit, d.h. Einbau der optischen Abtastung mittels Schwimmern und Lichtschranke konnten diese Probleme jedoch vollständig behoben werden. Die Reproduzierbarkeit der abgemessenen Volumina lag, bei absoluten Fördermengen im Bereich von 10 bis 25 ml, in der Größenordnung von 0.1 bis 0.2 ml. Dies entspricht einer maximalen Abweichung von 2% vom gewünschten, voreingestellten Wert.

In einem Testlauf (Synthese eines Hexapeptids) konnte das fehlerfreie Funktionieren der Apparatur gezeigt werden. Das Peptid (L-W-M-R-F-V) konnte nach Abspaltung vom Harz in einem einzigen Reinigungsschritt, mittels Gelchromatographie, zur Homogenität gereinigt werden.

Nach erneuter Modifikation des Steuerprogramms (Erhöhung der Bedienungsfreundlichkeit und -sicherheit) wurden die beiden DBP-Analoga auf dem Syntheseautomaten hergestellt. Auch diese, insgesamt 40 Kupplungszyklen umfassenden Synthesen verliefen ohne technische Schwierigkeiten.

Wie die Resultate aus der Aufarbeitung und Charakterisierung (Elutionsprofile der G-50-Chromatographie, RP-HPLC-Profile) zeigen (Abb. 23, Abb. 25), ist die Qualität dieser beiden Peptide, unter Berücksichtigung der Sequenzmodifikationen, durchaus mit derjenigen der in manueller Synthese hergestellten Peptide DBP und Val¹⁴-DBP vergleichbar.

Um einen direkten Vergleich zwischen manueller und automatischer Synthese zu erhalten, wurde das DDT-bindende Polypeptid ebenfalls mit Hilfe des Automaten synthetisiert. Das vom Harz abgespaltene Rohpeptid zeigte bei der Aufarbeitung das bekannte Verhalten. Chromatographische Eigenschaften und Ergebnisse der Aminosäureanalysen waren ebenfalls identisch zu den aus mehreren manuell ausgeführten Synthesen, vorliegenden Daten (Hehlhans & Klauser, 1986). Zur Illustration sind in Abbildung 30 die RP-HPLC-Chromatogramme der G-50-Fractionen eines manuell und eines automatisch synthetisierten Produktes abgebildet. Daraus wird ersichtlich, dass die Qualität des mit Hilfe des Synthese-Automaten hergestellten Peptids im Vergleich zu den bisherigen Ansätzen mindestens ebenbürtig, wenn nicht sogar höher ist. Die Befürchtungen hinsichtlich Stabilität der Reagenzien (Trifluoressigsäure- und Triethylamin-Lösung) erwiesen sich, zumindest beim angewendeten Zeitschema, als unbegründet. Damit kann, neben dem fehlerfreien technischen Funktionieren des Automaten auch die Qualität der automatisch synthetisierten Peptide gewährleistet werden.

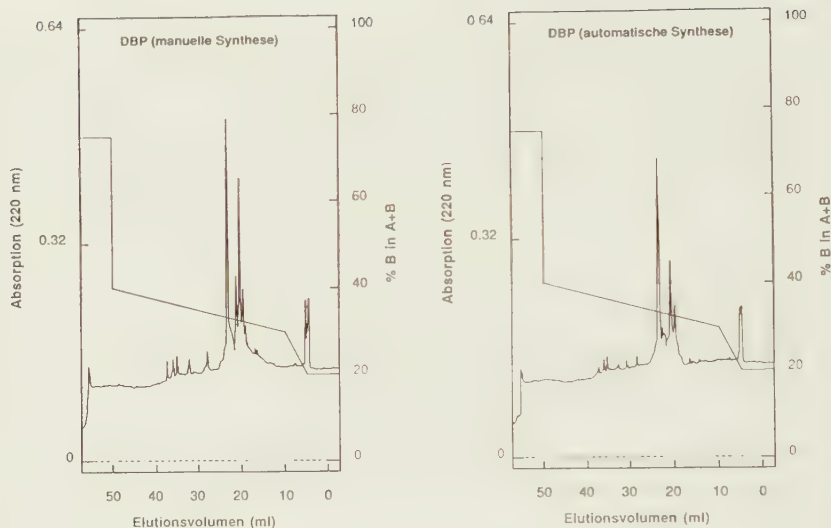


Abbildung 30: RP-HPLC-Chromatogramme der Produkte aus manueller und automatischer Synthese des DDT-bindenden Polypeptids (G-50 Aggregat-Fractionen).

Lösungsmittelsystem: A: 0.1% TFA; B: 100% Acetonitril; Säule: NS-300 5C8

Trotz dieser erfreulichen Resultate wird jedoch ein weiterer Ausbau des Systems in Betracht gezogen. Dies betrifft in einem ersten Schritt vor allem die Neuprogrammierung des Mikrocomputers für Peptidsynthesen nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie. Gleichzeitig soll, durch Auswertung der bisherigen Erfahrungen die Sicherheit und Bedienungsfreundlichkeit des Systems noch weiter erhöht werden.

Mit Hilfe eines kleinen Zusatzprogramms und einer elektronischen Schaltung zur Erkennung von Netzausfällen (Stromversorgung) soll die Maschine gegen derartige, allerdings sehr selten vorkommende Ereignisse geschützt werden.

In weiteren Ausbausritten ist auch die, vorerst ausgesparte Automatisierung der Aminosäure-Derivat- und Kupplungsreagens-Zugabe, sowie die automatische Aufbereitung der Reagenslösungen, geplant.

3.4 ANTIKOERPER GEGEN DAS DDT-BINDENDE POLYPEPTID

Die Immunisierung der 3 Kaninchen (2 mit der hochmolekularen Aggregatform und 1 mit der Monomer-Fraktion) erfolgte nach dem beschriebenen Prozedere. In allen 3 Fällen konnte schon im 2. Testserum (8 Wochen nach der 1. Injektion) ein hoher Gehalt an spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Diese ersten Ergebnisse bestätigten, dass der Entscheid, die Peptid-Fractionen direkt, d.h. ohne Kupplung an ein Trägerprotein, für die Immunisierung einzusetzen, richtig gewesen war. Den Erwartungen entsprechend weisen beide Peptid-Fractionen eine hohe antigene Potenz auf. Aufgrund dieser ersten Ergebnisse wurde die Immunisierung, zur Erreichung maximaler Antikörper-Titer, fortgesetzt.

Die Schwierigkeiten, welche aufgrund der schlechten Löslichkeit des Peptids in neutralen, wässrigen Lösungen (PBS), beim Aufbringen des Antigens auf die Microtiterplatten aufgetreten waren, konnten nach einer Testserie mit verschiedenen Lösungsmitteln, durch Verwendung von 1 M Essigsäure behoben werden. Mit diesem Lösungsmittel konnte eine, für einen empfindlichen Nachweis benötigte, vollständige Beschichtung der PVC-Oberfläche erreicht werden.

Nachdem die Eignung des gewählten RIA-Testsystems bezüglich Reproduzierbarkeit in mehreren Ansätzen gezeigt worden war, wurden Versuche zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit durchgeführt. Abbildung 31 zeigt den Verlauf der Serumtitrationskurven bei konstanten, auf die Microtiterplatten aufgetragenen Peptidmengen. Daraus wird ersichtlich, dass bei einer Serumverdünnung von ca. 1:1000 (Wendepunkt der halblogarithmischen Kurven) mit maximaler Empfindlichkeit gearbeitet werden kann. Dies ist vor allem für den nach der Kompetitions-Methode durchgeführten Test von Bedeutung, kann doch bei diesen Serumverdünnungen, bei unterschiedlichen, mit den Seren inkubierten Peptidmengen, mit maximalen Signal-Differenzen gerechnet werden.

Die Versuche zur Bestimmung der Kreuzreaktivität zwischen den beiden Antiseren und den beiden Antigenen zeigten, dass die Kreuzreaktion, erwartungsgemäss, stets zu 100% erfolgt. Auffällig ist jedoch, dass mit dem Anti-Monomer-Serum, unabhängig von der Art des im RIA eingesetzten Antigens, stets weniger Radioaktivität und dementsprechend auch weniger Antikörper nachgewiesen werden konnten. Neben einem niedrigeren Titer dürfte auch die geringere Affinität der Anti-Monomer-Antikörper für dieses Ergebnis verantwortlich sein. Obwohl für einen signifikanten Beweis die Immunisierung einer grösseren Anzahl von Kaninchen notwendig wäre, lassen die vorliegenden Daten den Schluss zu, dass, bedingt durch das höhere Molekulargewicht und damit verbundener grösserer Stabilität, das Aggregat im Vergleich zum Monomer, eine erhöhte immunogene Wirkung zeigt.

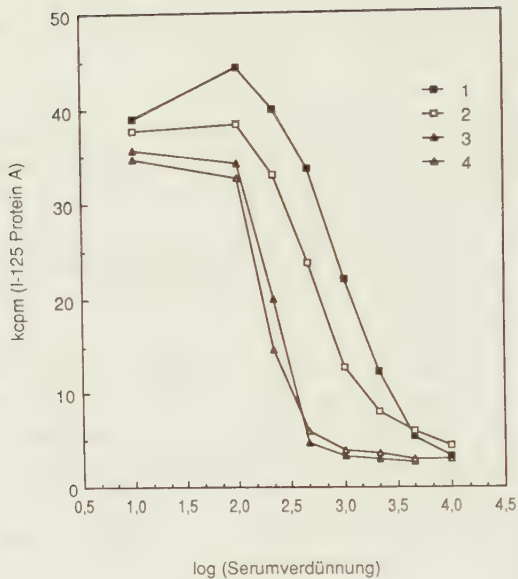


Abbildung 31: Radioimmunologische Untersuchung der Anti-Aggregat- und Anti-Monomer-Antisera gegen das DDT-bindende Polypeptid.

- 1 = Anti-Aggregat-Antiserum, getestet gegen DBP-Aggregat
- 2 = Anti-Aggregat-Antiserum, getestet gegen DBP-Monomer
- 3 = Anti-Monomer-Antiserum, getestet gegen DBP-Aggregat
- 4 = Anti-Monomer-Antiserum, getestet gegen DBP-Monomer

Nachdem nach weiteren "Booster"-Injektionen keine Erhöhung des Antikörper-Titers mehr festgestellt werden konnte, wurde die detailliertere Charakterisierung der Anti-DBP-Antikörper in Angriff genommen.

Anhand der Antiserum-Titrationskurven wurden Bestimmungen der immunologischen Nachweisgrenze für das DBP vorgenommen. Bei mehrfach ausgeführten Tests nach dem kompetitiven Verfahren konnten Peptidmengen in der Größenordnung von 10 bis 20 pMol (30-60 ng) eindeutig nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist insofern von Interesse, als damit Möglichkeiten

für den Nachweis der Expression eines synthetischen, in *Escherichia coli* klonierten DBP-Gens (Moser, 1986) geschaffen sind. Wie jedoch entsprechende Experimente zeigten (Moser, 1986; Frey, 1986), führen Interferenzen zwischen Antikörpern im Testserum und bakteriellen Proteinen zu einer markanten Anhebung dieser Nachweisgrenze. Durch Optimierung in der Aufarbeitung der zu testenden Proben gelang es, Peptidmengen im Bereich von 100 bis 200 pMol, auch in Anwesenheit anderer bakterieller Peptide und Proteine, nachzuweisen (Moser, 1986).

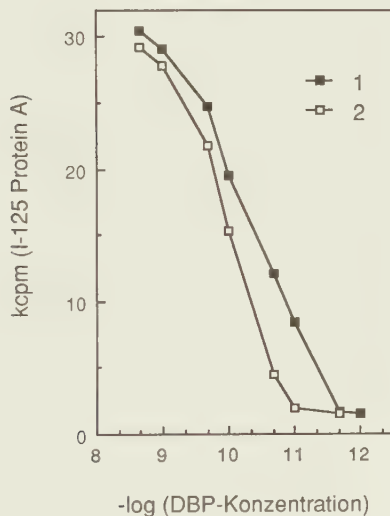


Abbildung 32: Bestimmung der radioimmunologischen Nachweisgrenzen für die Aggregat-Fraktion des DDT-bindenden Polypeptids. Für den Test wurden die, mittels Affinitätschromatographie isolierten Antiseren eingesetzt. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen den für die Inkubation auf den Microtiterplatten eingesetzten Peptidmengen.

1 = Anti-(DBP-Aggregat)-Antiserum; 2 = Anti-(DBP-Monomer)-Antiserum

Die weitere Charakterisierung der Anti-DBP-Antikörper war in Zusammenarbeit mit D. Holenstein durchgeführt worden (Holenstein, 1984). Unter Anwendung herkömmlicher Methoden (Ammoniumsulfat-Fällungen, Ionenaustausch- Chromatographie) und spezifischer Affinitätschromatographie konnten die DBP-erkennenden Immunglobulin G-Fractionen isoliert werden. Abschätzungen anhand der Elutionsprofile der Aggregat- und Monomer-Affinitätsäulen ergaben für die spezifischen Antikörper einen Anteil von 4 bis 8% der gesamten IgG-Mengen (Holenstein, 1984). Auch an den isolierten, spezifischen IgG-Fractionen konnten die schon beim Test der Seren beobachteten Unterschiede (Affinität) zwischen Anti-Monomer- und Anti-Aggregat-Antikörpern festgestellt werden. Die Bestimmungen der Nachweisgrenze für das DBP wurde auch mit den spezifischen IgG-Fractionen durchgeführt. Die im direkten Test ermittelten Werte bestätigten die zuvor schon aus den Tests mit den Seren erhaltenen Resultate. Peptidmengen von 9 bis 10 pMol (ca. 30 ng) ergaben ein noch signifikant über dem experimentellen Rauschen liegendes Signal.

Da mit dem DDT-bindenden Polypeptid ein relativ kleines, gut definiertes und zudem potentes Antigen zur Verfügung steht, wurden auch Experimente zur Bestimmung der antigenen Determinaten ausgeführt. Im kompetitiven RIA zeigte sich, dass zwar die grösseren chymotryptischen Fragmente (Ser 12-Phe 24, Ile 4- Met 11) von den Antikörpern erkannt und gebunden werden, eine vollständige Inhibition aber, wie sie mit dem ganzen Peptid erreicht werden konnte, auch durch Ueberschüsse der Fragmente nicht zu erzielen ist. Auch die Kombination verschiedener Fragmente ergab keine Verbesserung dieses Resultats. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass für die optimale Erkennung des Peptids durch die Antikörper die Sekundärstruktur des DBP massgebend ist. Die Spaltung des Peptids in Fragmente führt vermutlich zu einer Erhöhung des Anteils ungeordneter Strukturen und damit, zumindest teilweise, zu einer Zerstörung der offenbar konformationellen Determinanten.

Die, sowohl im direkten, als auch im kompetitiven Test untersuchten Analoga des DDT-bindenden Polypeptids (Thr¹⁵, Thr¹⁷-DBP, Trp¹⁶-DBP, Val¹⁴-DBP) zeigten in ihrem Verhalten gegenüber den Antikörpern die gleichen Eigenschaften wie das zur Immunisierung eingesetzte ursprüngliche Peptid. Die Serumtitrationskurven können, innerhalb der experimentellen Bandbreite zur Deckung gebracht werden. Die kleinsten, immunologisch noch nachweisbaren Mengen lagen ebenfalls im unteren Picomol-Bereich.

Offensichtlich bringen die eingeführten Substitutionen, im Vergleich zum DBP, keine, oder nur geringfügige Veränderungen der Sekundärstruktur mit sich. Auch ist aufgrund dieser Resultate anzunehmen, dass die ausgetauschten Aminosäure-Seitenketten (Tyr 15 und 17 -> Thr; His 16 -> Trp; Phe 14 -> Val) keinen direkten Einfluss auf die Struktur des Peptids und damit der antigenen Determinanten ausüben.

Die Resultate aus der immunologischen Charakterisierung des DDT-bindenden Polypeptids und der Analoga lassen den Schluss zu, dass die Peptide offensichtlich recht grosse Anteile an definierten,

stabilen Sekundärstrukturen aufweisen. Inwieweit die tatsächliche Struktur jedoch mit dem postulierten Modell übereinstimmt, kann auch mit immunologischen Methoden nicht definitiv gezeigt werden. Zusammen mit den Ergebnissen der DDT-Bindungsbestimmung und den Sekundärstrukturvorhersagen deuten diese Resultate jedoch darauf hin, dass die tatsächliche Sekundärstruktur mit der postulierten im wesentlichen übereinstimmt.

Die Kenntnis der räumlichen Struktur des DBP aus röntgenkristallographischen Analysen könnte für eine weiterführende Interpretation der vorliegenden immunologischen Daten wertvolle Ansatzpunkte liefern. Insbesondere sollte es dann möglich sein, Zahl, Orientierung und Struktur der antigenen Determinanten des DDT-bindenden Polypeptids genau zu bestimmen.

3.5 ANTIKOERPER GEGEN DDT

3.5.1 Synthese von 5,9-Diaza-11,11,11-trichloro- 10,10-bis-(p-chlorophenyl)-4,8-dioxo-undecansäure

Wie im einleitenden Kapitel bereits erwähnt, zeigen kleinmolekulare Substanzen im allgemeinen keine immunogenen Wirkungen. Um gegen DDT, einem räumlich sehr kompakten Molekül, Antikörper zu erzeugen, muss dieses an einen hochmolekularen Träger gekuppelt werden. Da das Insektizid jedoch keine geeigneten funktionellen Gruppen aufweist, wurde zur Herstellung eines entsprechenden Derivats das strukturell nahezu identische Analogon Kelthan (DDT-OH) eingesetzt. Aufgrund der Arbeiten von Kaluszyner et al (Kaluszyner et al., 1963), welche durch Anwendung der "Ritter-Reaktion" neue Derivate des Insektizids herstellten, wurden die Experimente zur Einführung einer für unsere Zwecke geeigneten funktionellen Gruppe in das DDT-Molekül, durchgeführt. Die Synthese verschiedener Derivate und die Kupplung der schlussendlich erhaltenen Verbindung an ein Trägerprotein wurden in Zusammenarbeit mit D. Bürgisser ausgeführt. Eine ausführliche Diskussion der Resultate, sowie Ergebnisse der analytischen Charakterisierung der diversen Zwischenprodukte und des Endprodukts finden sich in der aus dieser Zusammenarbeit entstandenen Diplomarbeit (Bürgisser, 1986). Im folgenden sollen nur die wichtigsten Ergebnisse der gesamten Synthese kurz diskutiert werden.

Die Einführung von Brompropionitril in DDT-OH, unter Anwendung der "Ritter-Reaktion" ging problemlos und mit guten Ausbeuten vor sich. Das Produkt konnte durch einmaliges Umkristallisieren in reiner Form dargestellt werden. Von den zahlreichen Möglichkeiten zur Einführung der gewünschten primären Aminogruppe anstelle des Bromatoms, führte lediglich die unter Phasen-Transfer-katalytischen Bedingungen ausgeführte Substitution des Broms durch Azid zum geeigneten Zwischenprodukt. "Gabriel-Synthese" mit Phthalimid und Substitution mit Cyanid zeigten zwar nicht die erwarteten Ergebnisse, doch ist die dabei in beiden Fällen entstandene Verbindung, gerade für spätere Applikationen (Herstellung von DDT-Affinitätssäulen), von einigem Interesse. Schwierigkeiten waren bei der analytischen Charakterisierung der Verbindung aufgetreten. Erst die röntgenkristallographische Untersuchung ermöglichte eine eindeutige Identifikation des kristallinen Produkts. Dabei zeigte sich, dass es gar nie zur Bildung des gewünschten, N-substituierten Phthalimids, respektive der entsprechenden Cyanoverbindung gekommen war. Aufgrund der relativ hohen Basizität der beiden Anionen musste anstelle der Substitution, nach Abspaltung des Amidprotons durch die Base, der intramolekulare Ringschluss zum entsprechenden β -Lactam stattgefunden haben. In Abbildung 33 sind ermittelte Struktur und Stereoprojektion des N-DDT- β -Lactams dargestellt.

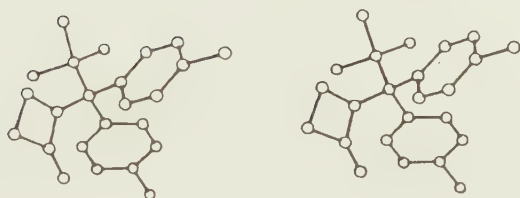
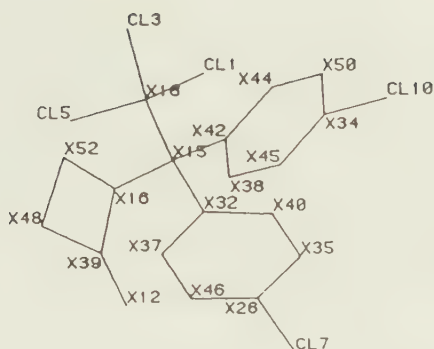


Abbildung 33: Durch Röntgenstrukturanalyse ermittelte Struktur des "N-DDT- β -Lactams"

Dieses Produkt sollte, durch Hydrolyse, ein ebenfalls für die Kupplung an ein Trägermaterial geeignetes DDT-Derivat mit freier Carboxylgruppe liefern (Abb. 34). Entsprechende Experimente sind geplant.

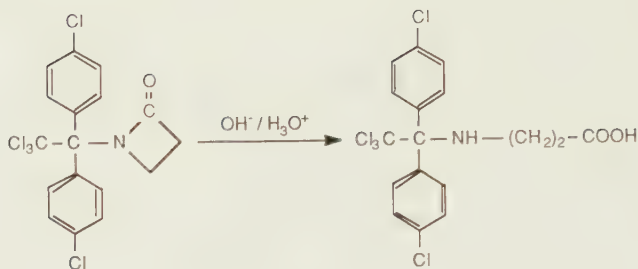


Abbildung 34: Hydrolyse von "N-DDT- β -Lactam" zum Carboxylderivat

Die Reduktion des Alkylazids zum primären Amin gelang mit der relativ selten eingesetzten Staudinger-Reaktion. Durch Verwendung von Triethylphosphit anstelle des üblicherweise eingesetzten Triphenylphosphins konnten Probleme mit der Aufarbeitung der in der nachfolgenden, 2-stufigen Spaltung mit HCl gebildeten Produkte behoben werden. Aus dem isolierten, primären Alkylamin-Hydrochlorid wurde, nach Freisetzung der Aminogruppe mit Pyridin, durch nucleophile Addition von Bernsteinsäureanhydrid, das Endprodukt der gesamten Synthese, 5,9-Diaza-11,11,11,11-trichloro-10,10-bis-(p-chlorophenyl)-4,8-dioxoundecansäure, hergestellt.

3.5.2 Kupplung des DDT-Derivats an Rinderserumalbumin

Nach den anfänglichen, auf der schlechten Wasserlöslichkeit beruhenden Schwierigkeiten mit der Kupplung des synthetisierten DDT-Derivats an Rinderserumalbumin, konnte ein System gefunden werden, welches nahezu beliebige Steuerung der Kupplungsausbeuten und des Besetzungsgrads (Epitopdichte) ermöglicht. Erreicht wurde dies durch Verwendung von Wasser-DMF-Gemischen als Lösungsmittel und EDC (einem wasserlöslichen Carbodimid) als Aktivierungsreagens für die Carboxylgruppen. Durch Variation der molaren Verhältnisse (BSA : DDT-Derivat : EDC) konnten Konjugate mit Epitopdichten von 11 bis 44 DDT-Reste pro BSA-Molekül hergestellt werden.

Nachdem der spektroskopische Nachweis der erfolgreichen Kupplung nur unbefriedigende Resultate geliefert hatte, wurde nach anderen Methoden gesucht. In Aminosäureanalysen der hydrolysierten Konjugate zeigte sich, dass mit Ausnahme der Werte für Phenylalanin, die Zusammensetzung genau

den Literaturwerten für BSA entsprach. Die erhöhten Phenylalaninwerte mussten sich also auf ein Hydrolyseprodukt aus dem, über einen "Spacer" eingeführten DDT-Rest, zurückführen lassen. Hydrolysen verschiedener Zwischenprodukte der DDT-Derivat-Synthese zeigten dann, dass es sich dabei um, aus der Hydrolyse des "Spacers" gebildetes β -Alanin handeln musste. Die Aminosäureanalyse einer Referenzlösung bestätigte diese Vermutung und zeigte zugleich, dass Phenylalanin und β -Alanin unter den für die Analyse verwendeten Pufferbedingungen die gleiche Retentionszeit aufweisen. Mit der Bestimmung des Farbfaktors von β -Alanin konnten die in der Analyse festgestellten, erhöhten Phenylalanin-Werte in die entsprechenden Epitopdichten umgerechnet werden.

3.5.3 Immunisierung und Nachweis der Antikörper

Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem DDT-BSA-Konjugat (25 DDT-Reste/BSA) verlief, wie entsprechende radioimmunologische Tests zeigten, erfolgreich. Der Nachweis von Antikörpern gegen das DDT-BSA-Konjugat zeigte schon mit dem ersten Testserum, gewonnen aus einer Blutprobe welche 4 Wochen nach der 1. Injektion abgenommen worden war, positive Resultate. Durch Fortsetzung der Immunisierung konnte eine Steigerung des Antikörpertiters erreicht werden.

Der Nachweis der DDT-spezifischen Antikörper wurde nach verschiedenen Methoden durchgeführt. Versuche die Hapten-spezifischen Antikörper durch Verwendung der Schafserumalbumin- und Kaninchenserumalbumin-DDT- Konjugate zu identifizieren ergaben jedoch keine eindeutigen Resultate. Dies ist vermutlich auf die grosse Aehnlichkeit (Sequenz- und Strukturhomologie) der Serumalbumine der verschiedenen Spezies zurückzuführen. Erfolgreich verliefen hingegen die Tests, in denen versucht wurde, die Bindung der Antikörper an das Konjugat durch Vorinkubation der Antiseren mit BSA und DDT zu inhibieren. In Abbildung 35 sind die zusammengefassten Ergebnisse aus mehreren radioimmunologischen Untersuchungen dargestellt.

Durch Zugabe steigender Mengen des Haptens DDT konnte eine zunehmende Inhibition der via ^{125}I -Protein A gebundene Radioaktivität erreicht werden. Wird zusätzlich noch Rinderserumalbumin zu diesen Testseren gegeben, so ist die Inhibition nahezu vollständig (85%), d.h. 85 % der Konjugat-erkennenden Antikörper können durch DDT oder BSA neutralisiert werden. Die restlichen 15 Prozent liessen sich auch durch Zugabe grösserer Mengen DDT oder BSA nicht mehr inhibieren. Dies ist vermutlich auf Antikörper, welche Determinanten erkennen, die in nativem BSA und in DDT nicht vorkommen (partiell oder vollständig denaturierte Bereiche im DDT-BSA-Konjugat), zurückzuführen.

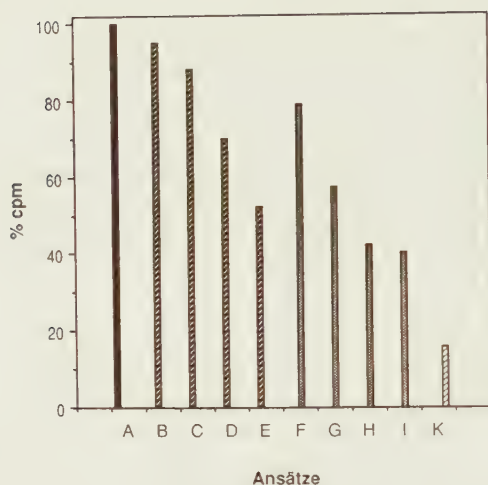


Abbildung 35: Radioimmunologische Charakterisierung des Anti-DDT-BSA-Konjugat-Antiserums.

Aufgetragen ist die durch Vorinkubation des Antiserums mit BSA und DDT erhaltene Abnahme der via Antikörper an das DDT-BSA-Konjugat gebundenen Radioaktivität (125 -Protein A).

A = Referenz (Antiserum ohne BSA und DDT)

B = Antiserum + BSA (3.2 nM)

D = Antiserum + BSA (80 nM)

F = Antiserum + DDT (0.2 mM)

H = Antiserum + DDT (5 mM)

K = Antiserum + DDT (25 mM) + BSA (400 nM)

C = Antiserum + BSA (16 nM)

E = Antiserum + BSA (400 nM)

G = Antiserum + DDT (1 mM)

I = Antiserum + DDT (25 mM)

Durch die Inkubation der Testseren mit DDA, p-Chlorophenol oder p-Chlorobenzoessäure wurde versucht, die Spezifität der Anti DDT-Antikörper zu testen. Mit p-Chlorobenzoessäure, auch in höheren Konzentrationen, konnte nur eine geringfügige Erniedrigung (ca. 10-15%) der gebundenen Radioaktivität erreicht werden. p-Chlorophenol führte, im Vergleich zu DDT, zu einer circa 25%-igen Neutralisierung, dies allerdings erst in relativ hohen Konzentrationen (25 μ M). Inwieweit diese Resultate auf spezifische Interaktionen zwischen den Antikörpern und den Testsubstanzen

zurückzuführen sind, bleibt unklar, mussten doch in beiden Fällen, zur Erreichung eines signifikanten Resultats, relativ grosse Konzentrationen eingesetzt werden. Vor allem bei p-Chlorobenzoesäure könnte die unter den Testbedingungen (pH 7.2) als Anion vorliegende Carboxylgruppe zu einer starken Beeinträchtigung der Antikörper-Hapten-Interaktionen führen, da anzunehmen ist, dass die Antigen-Bindungsstelle auf den Antikörpern für die Bindung des DDT-Rests aus apolaren Aminosäuren aufgebaut ist.

Die stärkste Kreuzreaktivität wurde erwartungsgemäss mit DDA erzielt. So lagen die gemessenen Counts, sowohl bei Inkubation der Testseren mit DDA, als auch mit DDA und BSA (bei den für den DDT-Nachweis eingesetzten Konzentrationen (siehe Abbildung 35)), lediglich um 20 (DDA/BSA) bis 50% (nur DDA) über den in Abbildung 35 aufgeführten Werten. Offenbar führt die bei DDA wiederum grösstenteils als Carboxylat vorliegende Gruppe (pH 7.2), im Vergleich zu p-Chlorobenzoesäure, zu einer wesentlich geringeren Beeinträchtigung der spezifischen Wechselwirkungen mit den Antigen-Bindungsstellen der Antikörper.

Aus den Ergebnissen dieser Spezifitätsuntersuchungen wurde geschlossen, dass das durch Immunisierung mit dem DDT-BSA-Konjugat erhaltene Antiserum erwartungsgemäss einen grossen Anteil von Anti-Protein-Antikörpern aufweist. Die DDT-erkennenden Antikörper weisen aber, wie die Tests mit p-Chlorophenol und p-Chlorobenzoesäure zeigten, eine recht hohe Spezifität für den hydrophoben DDT-Rest auf. Auch die strukturell ähnlichste Verbindung DDA wird von den spezifischen Antikörpern schlechter gebunden. Dies dürfte zum einen auf das Fehlen der Trichloromethylgruppe und zum andern, wie schon bei p-Chlorobenzoesäure, auf die unter den herrschenden pH-Bedingungen, deprotonierte Carboxylgruppe zurückzuführen sein.

Auf eine weiterführende Charakterisierung des Antiserums, respektive der spezifischen Anti-DDT-Antikörper wurde verzichtet, da mit der Erzeugung polyklonaler Antikörper ausschliesslich die Eignung des DDT-BSA-Konjugats als Immunogen getestet werden sollte.

Aufgrund der bisher erzielten, positiven Resultate, wird nun die Erzeugung entsprechender monoklonaler Antikörper in Angriff genommen. Sollte es gelingen, einen, für den DDT-Rest hochspezifischen Klon zu erzeugen und zu isolieren, stünde damit ein ideales DDT-bindendes Polypeptid zur Verfügung. Die Analyse und Charakterisierung (DDT-Bindung, Primär- und Sekundär-Strukturen der Bindungsstellen etc.) solcher Antikörper dürfte viele neue Hinweise zum Fragenkomplex um die Konstruktion künstlicher, funktioneller Peptide liefern.

LITERATURVERZEICHNIS

- Argos, P., Schwarz, J. & Schwarz, J. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 439, 261
- Atassi, M.Z. (1984) *Eur. J. Biochem.*, 145, 1
- Barany, G. & Merrifield, R.B. (1980) in: *The Peptides*, Vol. 2, (Gross, E. & Meienhofer, J., Eds.), pp. 1, Academic Press, New York
- Berson, S.A. & Yalow, R.S. (1971) in: *Immunobiology. Current Knowledge of Basic Concepts in Immunology and Their Clinical Application* (Good, R.A. & Fisher, D.W., Eds.), pp. 287, Sinauer, Stamford, Connecticut
- Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Pept. Protein Res.*, 25, 449
- Bürgisser, D. (1986) Diplomarbeit, Universität Zürich
- Centeno, E.R., Johnson, W.J. & Sehon, A.H. (1970) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 37, 1
- Chang, J.-Y. (1981) *Biochem. J.*, 199, 557
- Chakravarty, P.K., Mathur, K.B. & Dhar, M.M. (1973) *Experientia*, 29, 786
- Chou, P.Y. & Fasman G.D. (1978) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47, 45
- Clark, A.G. & Shamaan, N.A. (1984) *Pesticide Biochem. and Physiol.*, 22, 249
- Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J.M., Roberts, C.W., Katsoyannis, S. & Gordon, S. (1953) *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4879
- Epprecht, T. (1985) Diplomarbeit, Universität Zürich
- Erlanger, B.F. (1980) *Meth. Enzymol.*, 70, 85
- Finney, J.L. (1975) *J. Mol. Biol.*, 96, 721

Fischer, E. & Fourné, E. (1901) Ber. Dtsch. Chem. Ges., 34, 2868

Fishbein, L. (1976) in: Insecticide Biochemistry and Physiology (Wilkinson, C.F., Ed.), pp. 555, Plenum Press, New York

Frey, S. (1986) Diplomarbeit, Universität Zürich

Furuya, K. & Urasawa, S. (1981) Mol. Immunol., 18, 95

Geiger, R. (1984) Naturwissenschaften, 71, 252

Gisin, B.F. (1973) Helvetica Chim. Acta, 56(5), 1476

Gutte, B. & Merrifield, R.B. (1971) J. Biol. Chem., 246, 1922

Gutte, B., Däumigen, M. & Wittschieber, E. (1979) Nature, 281, 650

Gutte, B., Moser, R., Klauser, S. & Weilenmann, M. (1984) in: Dynamics of Biochemical Systems, (Ricard, J. & Cornish-Bowden, A., Eds.), pp. 259, Plenum Press, New York

Haas, G.J. & Guardia, E.J. (1968) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 129, 246

Hartley, B.S. (1970) Biochem.J., 119, 805

Hayes, W.J. (1962) in: Chemical and biological hazards in food (Ayres, Kraft, Snyder, Eds.), pp. 142, Iowa State University Press

Hélgans, T. & Klauser, S. (1986) Unveröffentlichte Arbeiten

Holenstein, D. (1984) Diplomarbeit, Universität Zürich

Hopp, T.P. & Woods, K.R. (1983) Mol. Immunol., 20, 483

Hummel, J.P. & Dreyer, W.J. (1962) Biochim. Biophys. Acta, 63, 530

Kalir, A. & Baldermann, D. (1976) Israel J. Entomol., 11, 147

- Kaluszyner, A., Blum, F. & Bergmann, E. (1963) J. Org. Chem., 28, 3588
- Kitchell, J.P. & Dyckes, D.F. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 701, 149
- Koziara, A., Osowska, K., Zawadzki, S. & Zwierzak, A. (1985) Synthesis, 202
- Krimen, L.I. & Cota, D.J. (1969) Org. Reactions, 17, 245, J. Wiley & Sons, New York
- Kullmann, W. (1984) J. Med. Chem., 27, 106
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) J. Mol. Biol., 157, 105
- Langen, H. (1984) Diplomarbeit, Universität Zürich
- Langen, H. (1986) Unveröffentlichte Arbeiten
- Lee, B. & Richards, F.M. (1971) J. Mol. Biol., 55, 379
- Lee, C.Z. & Atassi, M.Z. (1976) Biochem. J., 159, 89
- Levitt, M. (1978) Biochemistry, 17, 4277
- Linden, M. (1986) Diplomarbeit, Universität Zürich
- Lipke, H. & Kearns, C.W. (1959a) J. Biol. Chem., 234, 2123
- Lipke, H. & Kearns, C.W. (1959b) J. Biol. Chem., 234, 2129
- Merrifield, R.B. (1963) J. Am. Chem. Soc., 85, 2149
- Moser, R., Thomas, R.M. & Gutte, B. (1983) FEBS Lett., 157, 247
- Moser, R., Klauser, S., Leist, T., Langen, H., Epprecht, T. & Gutte, B. (1985) Angew. Chem., 97, 737
- Moser, R. (1986) Dissertation, Universität Zürich

- Nishina, T., Tsuji, A. & Fukushima, D. (1974) *Steroids*, 24, 861
- Pfaff, E., Mussgay, M., Böhm, H.O., Schulz, G.E. & Schaller, H. (1982) *EMBO J.*, 1, 869
- Provencher, S.M. & Glöckner, J. (1981) *Biochemistry*, 20, 33
- Provencher, S.M. (1982) *Comput. Phys. Commun.*, 27, 213
- Richards, F.M. (1974) *J. Mol. Biol.*, 82, 1
- Ritter, J.J. & Minieri, P.P. (1948) *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 4045
- Rockwell (1979) R6500 Microcomputer System, DATA SHEET, R650X
- Rockwell (1981) R6500 Microcomputer System, DATA SHEET, R6532
- Salnikow, J., Lehmann, A. & Wittmann-Liebold, B. (1981) *Anal. Biochem.*, 117, 433
- Salnikow, J., Lehmann, A. & Wittmann-Liebold, B. (1982) in: *Methods in Protein Sequence Analysis* (Elzinga, M., Ed.), pp. 181, The Humana Press, Clifton N.J.
- Schaefer, F. (1970) in: *The Chemistry of the Cyano Group* (Patai, S., Ed.), pp. 239, J. Wiley & Sons, New York
- Schnarr, G. & Maurizot, J.C. (1982) *Eur. J. Biochem.*, 128, 515
- Sheradsky, T. (1971) in: *The Chemistry of the Azido Group* (Patai, S., Ed.), pp. 331, J. Wiley & Sons, New York
- Tsugita, A. & Scheffler, J.J. (1982) *Eur. J. Biochem.*, 124, 585
- Veber, D.F., Freidinger, R.M., Perlow, D.S., Paleveda, W.J. Jr., Holly, F.W., Strachan, R.G., Nutt, R.F., Arison, B.H., Hommick, C., Randall, W.C., Glitzer, M.S., Saperstein, R. & Hirschmann, R. (1981) *Nature*, 292, 55
- Walter, G. & Doolittle, R.F. (1983) in: *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vol. 5 (Setlow, J.K. & Hollaender, A., Eds.), pp. 61, Plenum Press, New York

Weilenmann, M. (1983) Diplomarbeit, Universität Zürich

WHO (1979) DDT and its Derivatives, Geneva

Wilson, K.J., Rodger, K. & Hughes, G.J. (1979) FEBS Lett., 108, 87

Wilson, K.J., Hunziker, P.E., Lutz, H. & Hughes, G.J. (1980) Sci. Tools, 27, 23

Wünsch, E. (Ed.) (1974) in: Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, Bd. 15, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart

Zaks, R. (1981) Programmierung des 6502, SYBEX, Düsseldorf

Zaks, R. (1983) 6502 Anwendungen, SYBEX, Düsseldorf

CURRICULUM VITAE

Stephan Klauser von Flums (SG), geboren in Walenstadt (SG) am 15. Februar 1958

Ausbildung:

1965 - 1971	Primarschule Flums
1971 - 1973	Sekundarschule Flums
1973 - 1977	Kantonsschule Sargans (Oberreal-Abteilung)
1977	Maturität Typus C
1977 - 1982	Studium der Biochemie an der Universität Zürich
1982	Diplom der philosophischen Fakultät II der Universität Zürich
1982 - 1986	Ausführung der Dissertation am Biochemischen Institut der Universität Zürich unter der Leitung von Prof. Dr. B. Gutte

Berufliche Tätigkeit:

1981 - 1986	Lehrbeauftragter an der Abteilung Chemie der Aarg. Kantonsschule Baden
1982 - 1986	Assistent am Biochemischen Institut der Universität Zürich,

Bei folgenden Dozenten der Universität Zürich habe ich Vorlesungen, Übungen und Kurse besucht:

Prof. Dr. R. Bachofen, Prof. Dr. E. Batschelet, Prof. Dr. M. Billeter, Prof. Dr. M. Birnstiel,
Prof. Dr. H.R. Bosshard, Prof. Dr. E. Brun, Prof. Dr. Ph. Christen, PD Dr. C. Claude,
Prof. Dr. A.S. Dreiding, PD Dr. M. Egli, Prof. Dr. C.H. Eugster, Prof. Dr. H. Fischer, PD Dr. H. Gehring,
Prof. Dr. B. Gutte, Prof. Dr. A. Habich, Prof. Dr. H.J. Hediger, PD Dr. J. Hertz, Prof. Dr. M. Hesse,
Prof. Dr. R. Humbel, Prof. Dr. R. Huber, Dr. R. Jaussi, PD Dr. H. Jungen, Prof. Dr. J. Kägi,
Prof. Dr. W. Kündig, PD Dr. K. Lerch, Prof. Dr. V. Meyer, Prof. Dr. H.R. Oswald, Prof. Dr. O. Rohweder,
PD Dr. A. Salzer, Prof. Dr. W. Schaffner, PD Dr. V. Schmid, Prof. Dr. A. Steiner, Prof. Dr. M. Viscontini,
Prof. Dr. W. von Philipsborn, Prof. Dr. G. Wagnière, Prof. Dr. P. Waser, PD Dr. H. Weber,
Prof. Dr. Ch. Weissmann, Dr. K. Wilson, Prof. Dr. O. Woodtli

